UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II
Unités d'Enseignement et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques

ANNÉE 1973, THÈSE N° 664

ÉTUDE DE QUELQUES PROBLÈMES POSÉS PAR LE CONTROLE PHYSICO-CHIMIQUE DES MÉDICAMENTS

Travail du Laboratoire de Chimie Organique et de Contrôle Physico-Chimique des Médicaments.
(P. MESNARD)

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ
MENTION "PHARMACIE"

présentée et soutenue publiquement le mercredi 28 novembre 1973

par Catherine BANCONS née Mendiharat

le 3 juillet 1941 à Pau (Pyrénées-Atlantiques)

C. E. S. de Contrôle Physico-Chimique des Médicaments.
Ancienne assistante au Laboratoire de Chimie Organique et de Contrôle Physico-Chimique des Médicaments.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. P. MESNARD, Professeur, Président
R. GOLSE, Professeur. . . } Juges
R. CROCKETT, Professeur }
G. DEVAUX, Professeur . }

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547315_0006

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II
Unités d'Enseignement et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques

ANNÉE 1973, THÈSE N° 664

ÉTUDE DE QUELQUES PROBLÈMES POSÉS PAR LE CONTROLE PHYSICO-CHIMIQUE DES MÉDICAMENTS

Travail du Laboratoire de Chimie Organique et de Contrôle Physico-Chimique des Médicaments.
(P. MESNARD)

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ
MENTION "PHARMACIE"

présentée et soutenue publiquement le mercredi 28 novembre 1973

par Catherine BANCONS née Mendiharat

le 3 juillet 1941 à Pau (Pyrénées-Atlantiques)

C. E. S. de Contrôle Physico-Chimique des Médicaments.
Ancienne assistante au Laboratoire de Chimie Organique et de Contrôle Physico - Chimique des Médicaments.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. P. MESNARD, Professeur, Président
R. GOLSE, Professeur. . . | Juges
R. CROCKETT, Professeur | Juges
G. DEVAUX, Professeur . | Juges

UNIV. LEIDEN BIBL.

A LA MEMOIRE DE MON PERE.

A LA MEMOIRE DE PIERRE BANCONS.

A MA FAMILLE.

A MES AMIS.

A TOUT LE PERSONNEL DU LABORATOIRE DE
CHIMIE ORGANIQUE ET DE CONTROLE DES MEDICAMENTS.

(Professeur MESNARD)

Université de BORDEAUX II

Au cours de six années de collaboration et au delà du cadre de l'Université, une grande amitié nous a lié. Veuillez trouver ici le témoignage de notre fidélité et de notre très grande sympathie.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur G. DEVAUX

Professeur sans chaire à l'Université de BORDEAUX II

Licencié ès Sciences.

Vous n'avez cessé de nous guider et de nous encourager au cours de nos recherches. Lors d'une grande peine familiale, vous nous avez aidé et conseillé avec bienveillance.

Veuillez trouver ici le témoignage de notre profonde reconnaissance pour les marques de confiance que vous nous avez toujours témoignées.

Monsieur le Professeur R. CROCKETT

Professeur de Biochimie Pharmaceutique
à l'Université de BORDEAUX II
Ancien Assistant des Hôpitaux
Attaché des Hôpitaux
Collaborateur scientifique de l'INSERM
Chevalier des Palmes Académiques.

Dans l'atmosphère dynamique qui vous entoure, nous avons eu la joie et l'honneur de profiter de votre enseignement. Vous nous avez traitée avec la plus grande amabilité. Pour tout cela nous vous exprimons notre sincère gratitude.

Monsieur le Professeur R. GOLSE

Professeur de Chimie générale et minérale
Docteur ès Sciences physiques
Pharmacien des Hôpitaux
Officier des Palmes académiques

Nous avons pu apprécier la clarté et la minutie de votre enseignement. Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en acceptant de siéger dans notre jury de thèse.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur P. MESNARD

Professeur de Chimie Organique à l'Université de Bordeaux II

Docteur ès Sciences Physiques
Chevalier de la Légion d'Honneur
Officier de l'Ordre National du Mérite
Officier des Palmes Académiques
Officier de la Santé Publique
Médaille de Vermeil du Service de Santé de la Marine
Membre correspondant de l'Académie de Pharmacie
Membre correspondant de la Réal Académia de Pharmacia de Madrid et de l'Institut de Coimbra (Portugal)
Membre d'honneur de la Société de Pharmacie de Bénarès (Inde).

Monsieur,

Nous avons eu le privilège de bénéficier de votre enseignement, il fut toujours pour nous l'occasion d'heures passionnantes.

Nous avons été très sensible à l'accueil que vous nous avez fait dans votre laboratoire, et à l'aide spontanée que nous y avons trouvée auprès de vos collaborateurs.

Vous nous faites le très grand honneur de présider ce jury; que cette thèse soit l'expression de notre gratitude et de notre indéfectible attachement.

ETUDE DE QUELQUES PROBLEMES

POSES PAR LE CONTROLE PHYSICO-CHIMIQUE DES MEDICAMENTS

x

x x

INTRODUCTION

Le contrôle des médicaments, dont l'importance s'est considérablement accrue au cours des récentes années, constitue l'une des activités essentielles du pharmacien industriel. En effet, les progrès et les découvertes de la thérapeutique moderne ont entrainé l'apparition d'une foule de médicaments nouveaux, pour la plupart sous forme spécialisée. Il est nécessaire, avant leur délivrance aux malades, de vérifier leur conformité à la formule annoncée par le fabricant et d'assurer de leur non toxicité. Il s'en suit que le contrôle revêt différents aspects: analytique, pharmacologique, toxicologique, parfois bactériologique, clinique. Si sa valeur n'est pas absolue, un contrôle correctement réalisé donne au malade le maximum de sécurité.

Nous nous préoccupons dans ce travail du contrôle analytique dont le but est de vérifier les caractères physico-chimiques, la composition qualitative et quantitative des matières premières d'une part, du médicament terminé d'autre part, dont la complexité est à l'origine de nombreuses et fréquentes difficultés.

Dans le cadre de l'activité du Laboratoire de Contrôle des médicaments de l'Université de BORDEAUX II, nous avons été amenée à en résoudre quelques unes.

Après une discussion générale sur le contrôle des médicaments et plus spécialement sur le contrôle physico-chimique, nous envisagerons dans la première partie de ce travail les problèmes posés par les interférences entre le principe actif et l'excipient, dans la deuxième partie les problèmes posés par les interférences entre deux ou plusieurs principes actifs, dans la troisième partie un problème posé par les interférences simultanées, entre deux principes actifs d'une part, entre l'un des principes actifs et l'excipient d'autre part.

CONSIDERATIONS GENERALES

SUR LE CONTROLE DES MEDICAMENTS

CHAPITRE I

CARACTERE PARTICULIER DU CONTROLE DES MEDICAMENTS.

Si au départ tous les contrôles industriels ont un point commun qui est d'assurer la qualité des fabrications, chaque secteur de l'analyse offre un caractère propre selon l'objet du contrôle, qui impose des méthodes, des instruments, des réactifs, des objectifs particuliers. Alors que la micro-analyse organique élémentaire doit résoudre des problèmes de minéralisation, des pesées de prise d'essai, d'automation des techniques, l'analyse des hydrocarbures ou celle des plastiques par exemple, entraîneront des préoccupations très différentes:

La première mettra en jeu la mesure de la viscosité, de l'indice d'octane, la recherche d'impuretés soufrées etc.. La seconde par contre, posera des problèmes relatifs à la transparence, à la résistance à la chaleur, à la malléabilité, etc...

Le contrôle des médicaments constitue un secteur très spécialisé de l'analyse, comparable à la bromatologie dans le domaine des aliments. Nous essaierons de dégager les aspects, qui à notre sens, lui confèrent son originalité.

A - <u>LE CONTROLE DES MEDICAMENTS OBEIT A UNE OBLIGATION LEGALE</u>.

L'histoire de la pharmacie montre que depuis longtemps on se préoccupe de veiller à la qualité des drogues. Grâce à divers règlements dans les statuts de leur corporation, les apothicaires prévoyaient "l'inspection des drogues" pour s'assurer qu'elles n'étaient ni falsifiées, ni altérées. Les pharmacopées établirent ensuite pour chaque médicament, des normes officielles de pureté en décrivant les méthodes analytiques convenables.

Actuellement, le contrôle concerne surtout les spécialités pharmaceutiques dont la mise sur le marché est soumise à une autorisation accordée par le Service Central de la Pharmacie et des Médicaments du Ministère de la Santé Publique. (Cette autorisation a été récemment substituée au "Visa")

Rappelons tout d'abord la définition de la spécialité pharmaceutique, donnée par l'article L 601 du Code de la Santé Publique:

" On entend par spécialité pharmaceutique, tout médicament préparé à l'avance présenté sous un conditionnement particulier, caractérisé par une dénomination spéciale ".

D'après l'article L 601 de l'ordonnance du 4 février 1959, "le Visa n'est accordé à la spécialité que lorsque le fabricant justifie:

- "qu'il a fait procéder à la vérification de l'innocuité du produit dans les conditions normales d'emploi, de son intérêt thérapeutique, ainsi qu'à son analyse quantitative et qualitative.

- qu'il a prévu les conditions de fabrication et notamment des procédés de contrôle de nature à garantir la qualités du produit fabriqué".

Depuis 1959, un certain nombre de textes officiels ont été consacrés au contrôle, qui en définitive est régi par trois arrêtés :

L'arrêté du 26 Juin 1972 (contrôle analytique)
L'arrêté du 27 Avril 1972 (contrôle pharmacologique et toxicologique)
L'arrêté du 16 Mai 1972 (contrôle clinique).

Un dernier décret est paru le 21 Novembre 1972.
Ces arrêtés traduisent bien le triple aspect du contrôle dont nous avons parlé : un aspect analytique, un aspect pharmacologique et toxicologique, un aspect clinique.

Le fabricant doit joindre à son dossier trois rapports établis par des experts choisis sur une liste établie par le Ministère de la Santé Publique ; un expert analyste, un expert pharmacologue et toxicologue, un expert clinicien.

On s'assure ainsi de la conformité du médicament à la formule annoncée, de ses propriétés pharmacologiques, de sa non toxicité (éventuellement, de l'absence d'une action tératogène ou cancérigène), de ses indications thérapeutiques et de son mode d'emploi.

Les textes des trois arrêtés de 1972 sont annexés au projet de directive européenne relatif au rapprochement des législations des états membres du C.E.E. Les échanges internationaux imposent en effet l'harmonisation des législations nationales, pour le moment disparates.

La sévérité de la règlementation française a été influencée par les exigences de la F.D.A. (Food and drogs Administration), sans doute également à l'origine de la Convention Internationale Suisse du 3 Juin 1971, et de la Directive Allemande du 11 Juin 1971.

B - LE CONTROLE DES MEDICAMENTS EST DESTINE A GARANTIR LA CONFORMITE DU MEDICAMENT A LA FORMULE INDIQUEE PAR LE FABRICANT.

De tous les contrôles, seul le contrôle physicochimique offre un caractère permanent. Il est en effet réalisé non seulement en vue de l'autorisation de mise sur le marché, mais aussi, à l'occasion de toutes les fabrications. Aucun lot ne peut être commercialisé sans avoir au préalable été reconnu conforme par le laboratoire d'analyse. D'autre part, les experts pharmacologue, toxicologue et clinicien ne peuvent entreprendre leurs essais tant qu'ils ne sont pas en possession du rapport de l'expert analyste.

Le contrôle physicochimique répond à des considérations de sécurité et d'efficacité :

a - Sécurité.

La toxicité de certains médicaments, leur degré d'activité, leurs effets secondaires parfois difficilement prévisibles, "l'automédication" et la "pharmacomanie" croissantes dans la société actuelle imposent en effet une grande prudence et une vigilance incessante. Les accidents thérapeutiques de ces vingt dernières années (poudre Baumol, Stalinon Thalidomide, pour ne citer que les plus dramatiques), ont sensibilisé le public et on fait prendre aux divers responsables du médicament une conscience accrue de la nécessité de son analyse.

La législation tend précisément à prévenir tout accident dû à une étude technique insuffisante ou à une erreur lors de la fabrication. C'est d'ailleurs sur ce point que le contrôle des médicaments se distingue du contrôle dans le domaine de la Répression des Fraudes: il vise moins en effet à dépister une adultération consentie qu'à détecter une erreur involontaire.

b - Efficacité.

Cependant, s'il est bien de respecter le vieil adage "Primum non nocere", les médicaments ne sont pas des "Placebos", et on exige d'eux qu'ils soient efficaces. Les principes actifs doivent se trouver à dose suffisante pour exercer l'effet escompté. Ils ne doivent pas d'autre part se dégrader en composés inactifs, ce qui entraînerait un sous dosage du médicament.

C - LE CONTROLE DES MEDICAMENTS CONCERNE DES MELANGES COMPLEXES.

La transformation de la molécule médicamenteuse en formes d'administration fait intervenir des adjuvents divers : véhicules, stabilisants, édulcorants, colorants, conservateurs etc... dont la pharmacotechnie moderne fait un usage de plus en plus large : si autrefois le véhicule d'un sirop était simplement constitué d'une solution aqueuse de Saccharose, les sirops actuels contiennent couramment un nombre impressionnant de composants (*) à l'exclusion du sucre et même parfois de l'eau qu'on laisse au malade le soin d'ajouter!

(*) cf l'exemple page 26

Aux excipients des préparations dermatologiques autrefois inertes et analytiquement peu gênants, sont substitués des polyéthylènes glycols, des esters de Sorbitanne, des glycérides complexes ou synthétiques, diverses émulsions qui interfèrent souvent dans les réactions utilisées pour le dosage des principes actifs.

D'autre part, fréquentes sont les associations médicamenteuses regroupant dans une même formule plusieurs principes actifs, et dont les difficultés de l'analyse se trouvent multipliées d'autant. Cette complexité est aggravée par le fait que les mélanges à examiner sont toujours différents les uns des autres quant à leur formule, à l'inverse d'autres secteurs de l'analyse qui se préoccupent certes de mélanges complexes, mais de constitution qualitative et quantitative beaucoup plus constante: c'est le cas de l'analyse des liquides biologiques ou de l'analyse bromatologique par exemple: le sang, l'urine, le liquide gastrique, le lait ou le vin sont constitués d'un grand nombre de composants dont certains gêneront considérablement l'analyste; mais une fois les problèmes de leur élimination résolus, ils le seront une fois pour toutes.

Le contrôle des médicaments est au contraire une suite de cas particuliers, posant chacun un problème différent, soit à cause de la présence simultanée de plusieurs principes actifs interférant entre eux, soit à cause de la présence de tel ou tel excipient, soit encore du fait des proportions respectives des corps en présence etc... Ces considérations imposeront beaucoup de soin dans le choix des méthodes analytiques auxquelles il est demandé une parfaite fiabilité, une bonne reproductibilité et une précision suffisante.

D - PROBLEMES TRES PARTICULIERS POSES PAR LE CONTROLE DES MEDICAMENTS.

Certains aspects du contrôle des médicaments se rencontrent peu fréquemment dans les autres secteurs de l'analyse. Parmi les plus typiques, nous retiendrons le problème du vieillissement, le contrôle toujours difficile des médicaments homéopathiques, le contrôle très particulier des emballages. On pourrait y ajouter les essais bactériologiques auxquelles sont soumis les collyres et les préparations injectables, ainsi que les tests pharmacodynamiques, parfois seuls utilisables pour les médicaments d'origine biologique. Mais ces deux dernières catégories d'essai sortent du cadre du contrôle physocochimique auquel nous limiterons notre étude.

a - Problèmes de vieillissement.

Une spécialité pharmaceutique peut être le siège d'altérations diverses ayant pour résultat une perte plus ou moins importante de son activité thérapeutique, ou une augmentation de sa toxicité, due à l'apparition de produits de dégradation. Elles sont dûes principalement au facteur temps, mais peuvent aussi dépendre des conditions de stockage où interviennent l'humidité, la température, la lumière; leurs rôles sont parfois difficiles à déterminer.

C'est pour éviter le vieillissement que certains médicaments sont présentés sous forme de comprimés enrobés ou de dragées. En effet, l'enrobage a pour rôle d'isoler le principe actif du milieu extérieur et le protège des agents susceptibles de l'altérer. Ces formes galéniques amènent à un contrôle spécial, celui de la porosité. (17)

La nécessité d'étudier le comportement d'un médicament dans le temps imposerait d'effectuer des contrôles du produit pendant des mois, des années même, délai peu compatible avec les nécessités économiques d'une fabrication industrielle. Pour pallier cet inconvénient, des méthodes ont été proposées dites de "vieillissement accéléré"; elles consistent à soumettre le médicament, dans des conditions hygrométriques bien définies, à des températures supérieures à la température normale de conservation (35 à 100°). Les réactions de dégradation évoluent évidemment plus rapidement; cette méthode est pratiquement abandonnée et le législateur laisse à l'expert analyste le soin de régler le problème. En effet, l'arrêté du 26 Juin 1972 reste d'un laconisme surprenant:

" Les déterminations permettant d'estimer la durée de validité proposée par le demandeur sont décrites.

Les conclusions doivent comporter les résultats des analyses justifiant le délai de validité proposé dans les conditions normales, ou le cas échéant, dans des conditions particulières de conservation.

Une étude sur l'interaction du médicament et du récipient est présentée dans tous les cas où un risque de cet ordre peut être envisagé, notamment lorsqu'il s'agit de préparations injectables".

Enfin une limite d'utilisation est prévue pour chaque médicament. La date de péremption peut être indiquée en clair, antibiotiques par exemple, ou être codée, ce qui est le cas le plus fréquent.

b - Contrôle des médicaments homéopathiques.

Les très faibles quantités de principes actifs mises en oeuvre par l'homéophathie posent des problèmes d'analyse très particuliers. Il ne s'agit même plus de détermination de traces puisque les doses présentes sont infinitésimales; en effet au délà de la 9 ème centésimale hanemahnienne, le nombre d'Avogadro étant dépassé, il ne reste théoriquement plus de substance, alors que l'activité clinique est toujours constatée.

Pour le contrôle de ces hautes dilutions, l'analyste doit pour l'instant reconnaître son impuissance. Il est certain qu'à ces concentrations, la sécurité est indéniable, la notion de toxicité étant intimement liée à celle de dose. Cependant, légalement, le contrôle de ces formes est obligatoire et les efforts des analystes doivent porter sur la mise au point de techniques utilisables même dans ces conditions peu favorables.

c - Contrôle des articles de conditionnement.

Le contrôle des emballages ne se borne pas à la vérification des dimensions, souci que l'on retrouve dans toutes les industries équipées de chaînes automatiques.

Plus spécifique du contrôle des médicaments par contre est le contrôle de la qualité des conditionnements, en vue d'éviter l'altération du médicament qu'ils sont destinés à recevoir: essais de neutralité et de résistance hydrolytique des verres, analyse des élastomères et des polymères synthétiques, vérification du vernissage intérieur de certains emballages métalliques attaquables etc...

CHAPITRE II

DIFFICULTES POSEES PAR LE CONTROLE PHYSICOCHIMIQUE DES MEDICAMENTS.

Alors que le dosage de produits purs ne pose pas en général de grandes difficultés, il n'en est pas de même au niveau du médicament terminé, où la complexité des formes pharmaceutiques remet tout en question. Malgrè le nombre impressionnant des techniques analytiques dont nous disposons, on ne peut prétendre doser une molécule médicamenteuse par une méthode spécifique applicable à n'importe quelle forme galénique en présence de n'importe quel autre composé, principe actif ou excipient, par suite des interférences qui interviennent dans presque tous les cas.

Il peut poser d'autre part des problèmes de dosage proprement dit: il existe en effet des composés actifs pour lesquels aucune réaction analytique n'a été décrite et qui exigera une étude particulière de la part du fabricant et de son expert.

Certains corps enfin se trouvent en très faible concentration dans le médicament, soit à cause de leur importante activité pharmaco-dynamique, soit à cause de leur toxicité. Dans ces conditions la plupart des méthodes applicables ne seront pas suffisamment sensibles pour assurer un dosage précis.

A - EXEMPLES D'INTERFERENCES ENTRE LE PRINCIPE ACTIF ET L'EXCIPIENT.

1 - Préparations dermatologiques à base de corticostéroïdes.

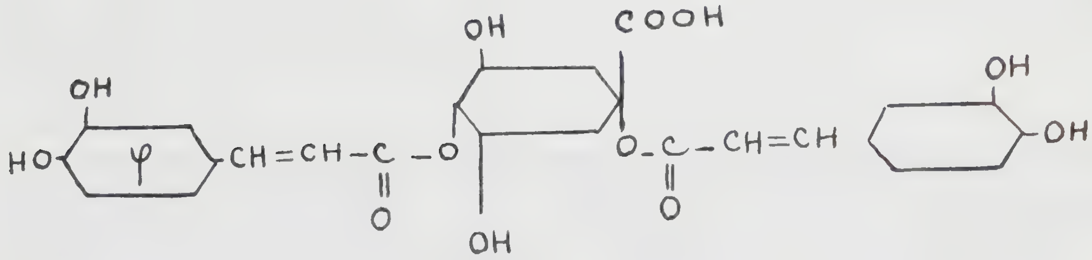
Le principe actif est dispersé soit au sein d'excipients anhydres, soit dans des émulsions E/H. Les méthodes les plus couramment utilisées pour la détermination des corticoïdes font appel à la réduction des sels de tétrazolium et à la spectrophotométrie U.V. Dans les deux cas les excipients interfèrent:

a - Par leurs propriétés réductrices vis à vis des sels de tétrazolium (polyéthylènes-glycol, fréquemment accompagnés de petites quantités d'aldéhydes, lanovaseline, polysorbats 80, sorbitol, ainsi qu'à un très faible degré la vaseline et l'huile de vaseline).

b - Par leur absorption en U.V. : le polysorbate 80, les para-hydroxybenzoates de méthyle et de propyle, de la lanovaseline et même de la vaseline absorbent très fortement à 240 mn (25). Comme d'autre part les solubilités du stéroïde et des excipients sont comparables, la séparation n'est pas réalisable. Il reste une possibilité: effectuer un blanc "excipient". Ce procédé ne nous semble toutefois qu'un pis aller, revenant en fin de compte à subordonner la précision du dosage du principe actif à la précision du dosage de l'excipient.

2 - <u>Comprimés à base de Cynarine</u> (16)

En solution aqueuse et en l'absence de substances glucidiques, la cynarine est aisément dosée par colorimétrie. Son hydrolyse alcaline à froid, par rupture des fonctions esters, conduit à l'acide quinique.



CYNARINE

Celui-ci est soumis à l'oxydation périodique; il se forme du dialdéhyde citrique que l'on condense avec l'acide thio-barbiturique en milieu acide. Il se développe une coloration rouge intense.

Mais cette méthode s'est révélée inapplicable au contrôle des comprimés: en effet, l'excipient, mélange de saccharose, de lactose et d'amidon conduit lui aussi, dans les conditions opératoires mises en oeuvre, à une importante coloration rouge dûe à l'oxydation périodique du saccharose.

La spectrophotométrie dans l'U.V. est par contre parfaitement utilisable: la cynarine absorbe en effet à 322-324 mn.

B - <u>EXEMPLES D'INTERFERENCES ENTRE DEUX OU PLUSIEURS PRINCIPES ACTIFS</u>.

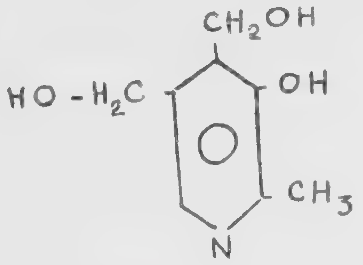
1 - <u>Association anti-tuberculeuse: Isoniazide-p. aminosalicylate de sodium</u>.

La plupart des techniques préconisées pour le dosage de l'isoniazide pur mettent à profit l'oxydation du groupement hydrazide; il est évident que l'acide amino-salicylique sera oxydé lui aussi (37).

Le problème peut être résolu soit par extraction préalable de l'isoniazide, soit après mise au point d'une technique applicable en présence de quantités importantes de P.A.S.

2 - <u>Association de la pyridoxine avec d'autres molécules similaires</u>.

Les méthodes de dosage spectrophotocolorimétrique de la vitamine B6 sont basées surtout sur la présence d'une fonction pseudophénolique non substituée en para, à laquelle on peut appliquer notamment la réaction très sensible à la dichloro 2-6 quinonechlorimide.



PYRIDOXINE

Mais la réaction peut être perturbée par les substances éventuellement associées dans les médicaments; les unes, comme les phénols non subtitués en para, donnent avec la D.C.Q.C. une coloration comparable à celle fournie par la pyridoxine. Les résultats sont par suite excédentaires.

D'autres substances comme la vitamine C au contraire empêchent le développement normal de la coloration, par suite de leurs propriétés réductrices (26).

L'analyste devra donc mettre au point une méthode adaptée au cas particulier que le préocoupe (14).

3 - Association néomycine-antibiotiques peptidiques (Bacitracine, Polymixine B, Tyrothricine, Viomycine, Pénicilline G) (29).

La réaction classique à la ninhydrine ne sera évidemment pas applicable en présence de ces antibiotiques.

C - PROBLEMES POSES PAR LE DOSAGE PROPREMENT DIT.

Pour certains principes actifs, il est difficile de trouver une méthode de dosage et l'analyste doit se borner à un essai qualitatif.

C'est le cas des dérivés d'oxydation des essences de Pin, Niaouli et Eucalyptus, utilisés en thérapeutique sous forme de soluté injectable, de suppositoires et de soluté pour pulvérisations nasales, pour leurs propriétés anti-infectieuses et balsamiques.

S'il est possible de différencier les essences oxydées, c'est-à-dire les matières premières, des essences initiales, et de les caractériser par un certain nombre de constantes physicochimiques, seule la chromatographie sur couche mince est applicable aux médicaments terminés, même en présence de terpine, par mise en oeuvre de mélanges solvants convenables.

La chromatographie gaz-liquide permet un contrôle plus précis (35).

CHAPITRE III

LE CONTROLE DES MEDICAMENTS SE RESOUD EN DEFINITIVE A DES CAS PARTICULIERS.

Pour un même principe actif, une méthode de contrôle valable pour une formule médicamenteuse déterminée ne l'est plus si les autres composants sont modifiés.

Un exemple nous en est fourni par le dosage de la sulfadiazine, dans des mélanges différents.

La molécule offre à l'analyste plusieurs possibilités :

- L'hydrogène libre du groupement SO_2 NH-R confère à la molécule des propriétés acides et peut, d'autre part, être substitué par :

  - l'argent
  - le cuivre
  - le mercure

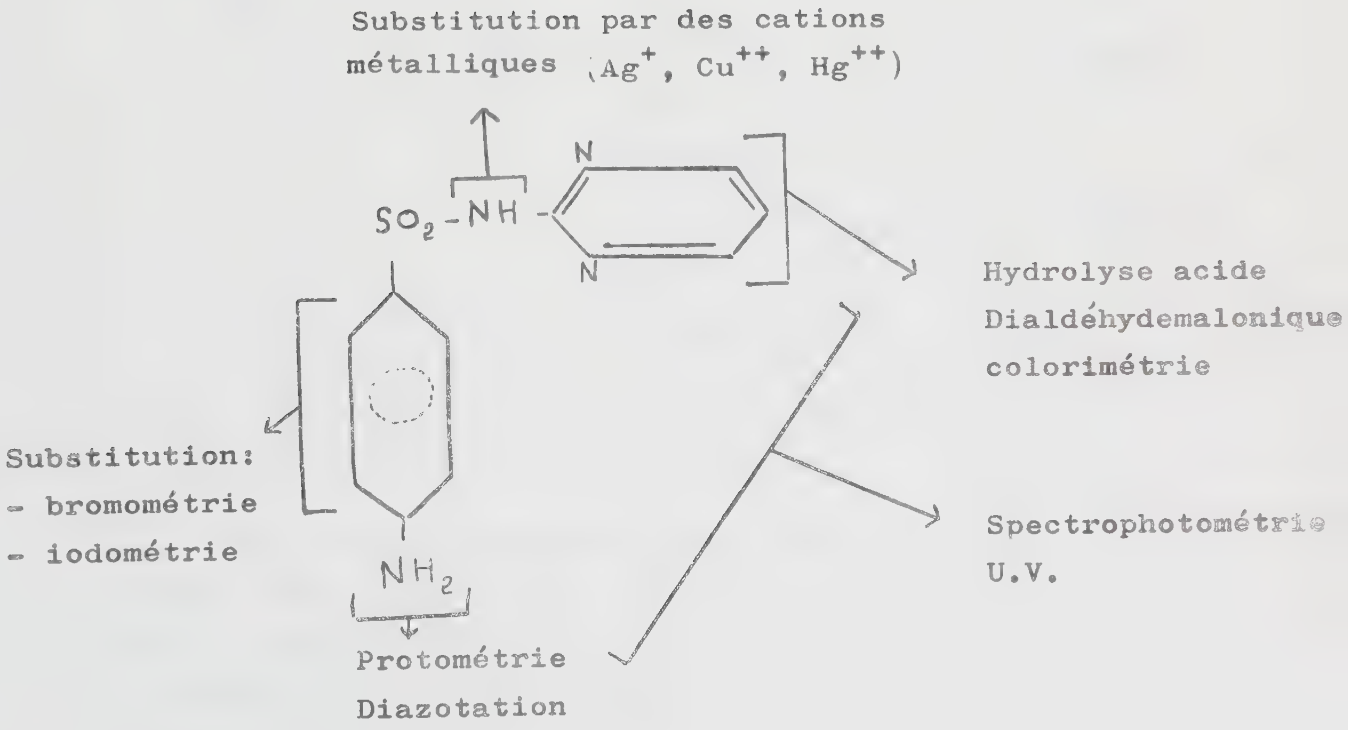
- La fonction amine en para entraîne un caractère basique, d'où possibilité d'un dosage protométrique. On peut aussi diazoter, et transformer le diazoïque obtenu en azoïque, dont la coloration se prête facilement à un dosage.

- La mobilité particulière des hydrogènes du noyau aromatique en ortho de la fonction amine favorise les réactions de substitution par les halogènes.

- D'autre part le noyau pyrimidique non substitué, fournit, après hydrolyse, du dialdéhyde malonique, justiciable de la réaction à l'acide thio-2-barbiturique.

- Enfin la sulfadiazine absorbe en U.V.; son maximum d'absorption se trouve à 240 nm.

<u>Tableau récapitulatif des possibilités réactionnelles de la sulfadiazine.</u>



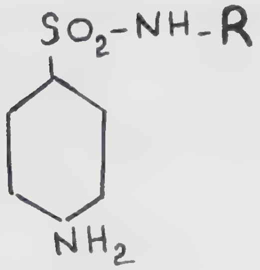
La méthode sera choisie en fonction des composants du médicament sulfamidé.

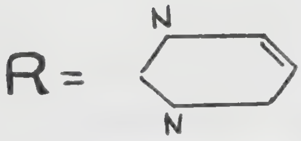
A - <u>Sulfadiazine seule</u>.

L'analyste a le choix entre les différentes méthodes.

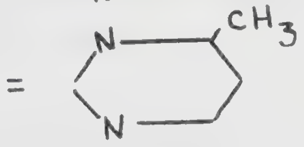
B - <u>Sulfadiazine associée à d'autres sulfamides</u>.

Dans le mélange ternaire Sulfadiazine - Sulfamérazine - Sulfathiazol:

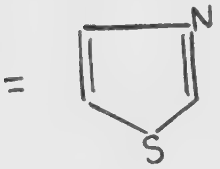




Sulfadiazine



Sulfamérazine



Sulfathiazol

Seule la spectrophotométrie dans l'U.V. est applicable. Les mesures sont effectuées à : 285 nm (Sulfathiazol + Sulfamérazine) et à : 240 nm (Sulfadiazine). Une précipitation par l'acide phtalique permet de ne conserver dans la solution que le Sulfathiazol, dosé par une nouvelle lecture à 285 nm.

C - <u>Sulfadiazine associée à des principes actifs non sulfamidés</u>.

G. MACHEK et COLL (30) ayant dû doser la sulfadiazine en présence de pénicillinate de procaïne, proposent d'évaluer d'abord ce dernier par voie biologique. Après dosage de l'ensemble des principes actifs par diazotation, ils soustraient ensuite les valeurs correspondant au pénicillinate.

Une telle méthode n'est cependant pas idéale, elle appelle une remarque analogue à celle que nous avons formulée à propos des médicaments à base de corticoïdes, et augmente les possibilités d'erreur, en subordonnant l'exactitude du dosage de la sulfadiazine à celle du dosage de la procaïne.

De plus, l'intensité de la coloration donnée par diazotation est trop importante et les auteurs sont obligés d'utiliser un blanc contenant le composé gênant, ce qui diminue encore la précision.

La réaction à l'acide thio-barbiturique permet le dosage de la sulfadiazine, hydrolysée en milieu acide en dialdéhyde malonique; la coloration rouge qu'il donne avec l'acide thiobarbiturique ne se forme évidemment pas par hydrolyse de la procaïne.

x x

x

TRAVAUX PERSONNELS

Notre expérience personnelle nous a placée devant différents problèmes que nous classerons comme précédemment:

- Problèmes posés par les interférences entre le principe actif et l'excipient.

- Problèmes posés par les interférences entre plusieurs principes actifs.

- Problèmes posés par les interférences entre les principes actifs d'une part, et entre les principes actifs et l'excipient d'autre part.

P R E M I E R E   P A R T I E

PROBLEMES POSES PAR LES INTERFERENCES ENTRE LE PRINCIPE ACTIF ET L'EXCIPIENT

Comme nous l'avons déjà souligné, il arrive que les excipients possèdent des possibilités réactionnelles importantes, et que leur complexité oblige à une recherche analytique non prévue et différente pour chaque médicament.

Nous rapportons ici le contrôle d'un sirop et d'une préparation dermatologique pour lequel nous nous sommes heurtée à de nombreuses difficultés dues à la composition ou à la nature de l'excipient.

CHAPITRE I

DOSAGE DE LA DIPHESATINE DANS UN SIROP

Nous avons analysé un sirop répondant à la formule suivante:

Diacétoxydiphénylisatine	0,040	g
Benzoate de Sodium	0,250	g
Veegum H.V. (1)	0,550	g
Acide citrique	0,290	g
Sucre	17,750	g
Jus de cerise concentré	1,200	g
Aldehyde benzoïque	0,006	g
Rouge amaranthe	0,005	g
Edifas BX 100 (2)..........................	1,100	g
Nipagine M	0,100	g
Pluronic F 68 (3)	2,000	g
Saccharinate de Sodium	0,010	g
Eau distillée .... Q.S.	100	ml

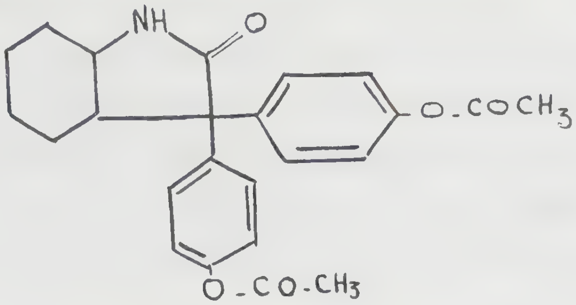
---

(1) Veegum HV.complexe colloïdal hautement purifié de silicate de magnésium et d'aluminium. Il se présente sous forme de paillettes blanches.

(2) Edifas BX 100.Carboxymethylcellulose de sodium, le coefficient X 100 indiquant le degré de viscosité.

(3) Pluronic F 68.polymère résultant de la condensation de l'oxyde d'éthylène et de l'oxyde de propylène.

Le principe actif, la diphésatine, est un purgatif cathartique, répondant à la formule : (12)



3 - 3 Bis (p-acétoxy-phényl) oxindole.

Nous avons envisagé :

- le dosage de la diphésatine pure
- son dosage dans le sirop.

I - DOSAGE DE LA DIPHESATINE PURE.

Travaux antérieurs

Différentes méthodes de dosage de la diphésatine ont été préconisées :

.- Gravimétrie : la pesée de la diphénylisatine obtenue après hydrolyse de son ester (46) nous semble contre-indiquée par sa longueur et par la nécessité d'une prise d'essai trop importante.

.- Bromométrie (5) : cette méthode est difficilement applicable en milieu complexe.

.- Colorimétrie : à l'exception de celle de MAJOR (31) basée sur une oxydation par le nitrate d'argent en milieu alcalin et qui, dans notre cas, s'est révélée d'application délicate, la plupart des techniques colorimétriques (3) (27) , (52) utilisent la réaction décrite par CHRISTENSEN (13) : formation d'une coloration rouge violacée après hydrolyse de la diphésatine en milieu alcalin, suivie d'une oxydation par le ferricyanure de potassium.

Nous avons orienté nos recherches dans ce sens.

Travaux personnels

A - Choix de la méthode.

La mise en oeuvre des méthodes colorimétriques ne nous a pas donné de résultats satisfaisants, par suite d'une cinétique trop rapide et du manque de stabilité de la coloration. Dans le but de remédier à ces inconvénients, nous avons repris la réaction de CHRISTENSEN, nous en avons précisé les divers paramètres et avons apporté les modifications nécessaires.

B - Etude des paramètres de la réaction.

Nous avons envisagé successivement :

L'influence de la nature du solvant, de la composition du réactif, de la lumière et de la température, le spectre d'absorption, la cinétique de la réaction en fonction de la concentration en diphésatine. (*)

(*) Toutes nos mesures ont été effectuées au spectophotomètre Unicam SP 600, en cuves de 1 cm.

1 - Le solvant

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec un mélange hydro-éthanolique à 50%; en effet, si la réaction est moins rapide que dans un milieu plus concentré en alcool (75%), elle est sensiblement la même pour toutes les concentrations en diphésatine comme le montrent les expériences ultérieures, et permet d'obtenir une stabilisation du maximum d'intensité (Figure 1)

Influence de la concentration en alcool

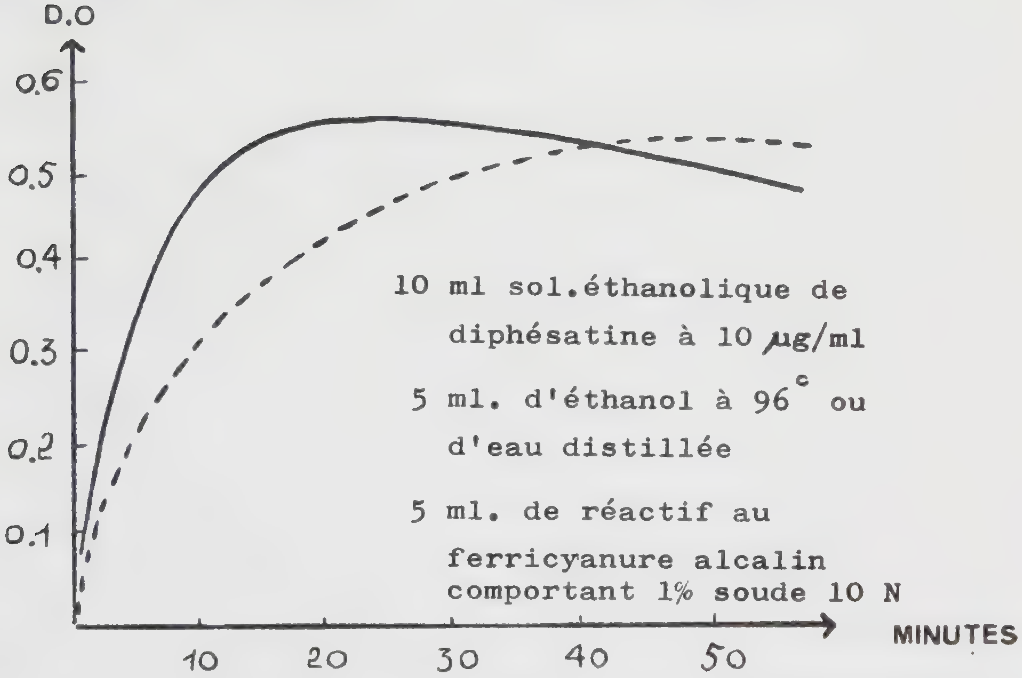


Fig. 1 - ——— Concentration en alcool : 75%;
- - - - Concentration en alcool : 50% (étude réalisée sur 100 µg de diphésatine).

2 - Le réactif

Le réactif est une solution aqueuse de ferricyanure de potassium en milieu sodique. Nos essais, effectués sur 80 µg de diphésatine, nous ont fait adopter une solution à 0,10% additionnée de 1% de soude 10 N.

Avec un réactif de même alcalinité, mais plus concentré en ferricyanure, ou de même concentration en ferricyanure mais plus alcalin, nous avons constaté que si la coloration atteint plus rapidement son maximum d'intensité, elle ne présente par contre aucune stabilité. Au contraire, avec le réactif choisi, elle atteint son maximum au bout de 40 mn et reste stable pendant 50 mn au moins (Figure 2).

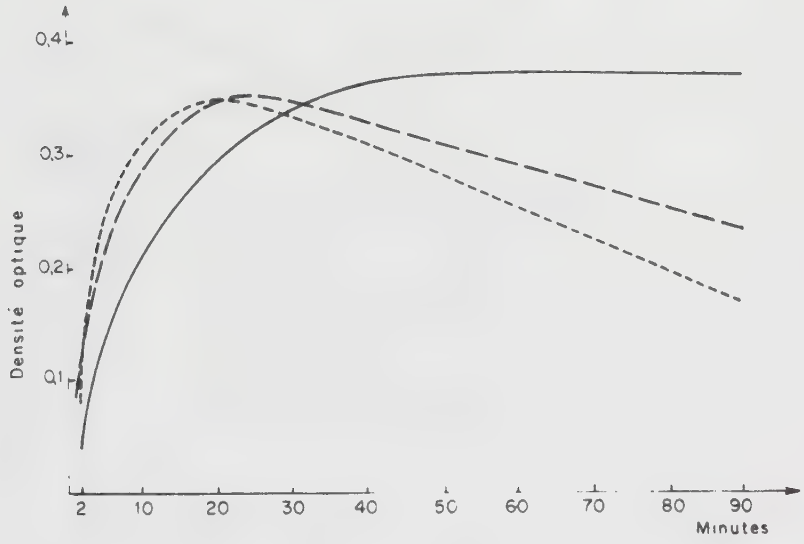


Fig. 2 Influence de l'alcalinité du réactif sur la cinétique de la réaction (étude réalisée sur 80 µg de diphésatine).

2 ml de solution alcoolique de diphésatine à 40 µg/ml. — 8 ml d'éthanol à 96°. — 5.000 ml d'eau distillée. — 5.000 ml d'un des réactifs suivants : ——— Solution aqueuse de ferricyanure de potassium à 0,1 % comportant 1 % de soude 10 N; — — — Solution aqueuse de ferricyanure de potassium à 0,1 % comportant 1,5 % de soude 10N; ---- Solution aqueuse de ferricyanure de potassium à 0,1 % comportant 2 % de soude 10 N.

3 - Influence de la lumière et de la température.

La coloration est moins intense si elle se développe à la lumière. Un essai après chauffage au bain-marie à 80° pendant 15 mn a permis de constater que le maximum d'intensité est obtenu plus rapidement et possède une valeur légèrement plus élevée; mais il ne présente aucune stabilité (Figure 3). Nous opérons donc à l'obscurité et à température ordinaire.

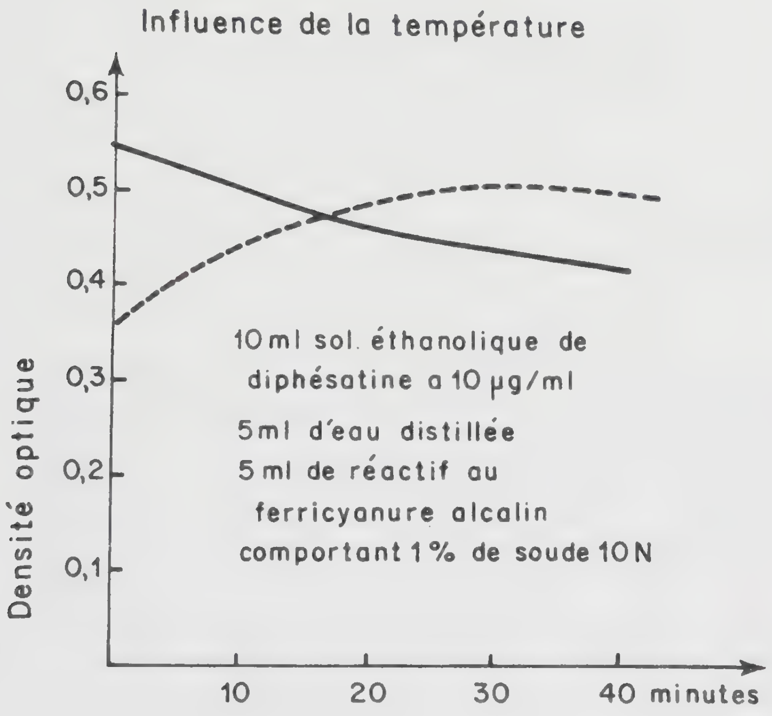


Fig. 3 - ——— Après 15 minutes au bain-marie à 80° ;
----- Après 15 minutes à froid (étude réalisée sur 100 µg de diphésatine).

4 - Etude du spectre d'absorption.

Toutes les mesures ayant été jusqu'ici effectuées à 560 nm, longueur d'onde classiquement admise, nous avons précisé l'allure spectrale de la coloration obtenue dans nos conditions opératoires, avec notre réactif. Comme le montre la figure 4, le maximum d'absorption est situé à 570 nm.

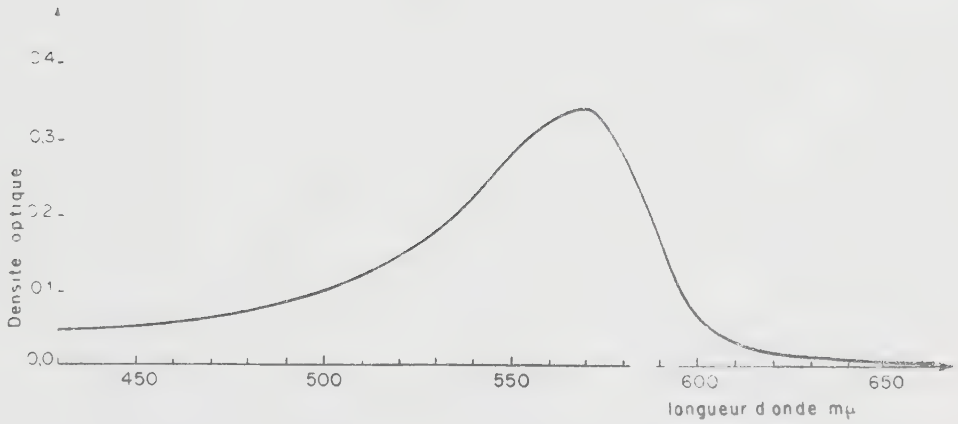


Fig 4 — Spectre d'absorption (réalisé sur 80 µg de diphésatine).

5 - Influence de la concentration en diphésatine sur la cinétique de la réaction.

Nous avons mis en oeuvre des quantités variant entre 20 µg et 280 µg dans le milieu réactionnel, soit entre 1 µg/ml et 14 µg/ml.

Le maximum d'intensité est atteint plus ou moins rapidement selon la concentration en diphésatine, mais dans tous les cas la stabilité de la coloration est suffisante pour permettre une lecture :

. à partir de 35 mn pour des concentrations entre 20 et 80 µg.

. à partir de 65 mn pour des concentrations entre 100 et 280 µg. (Figure 5).

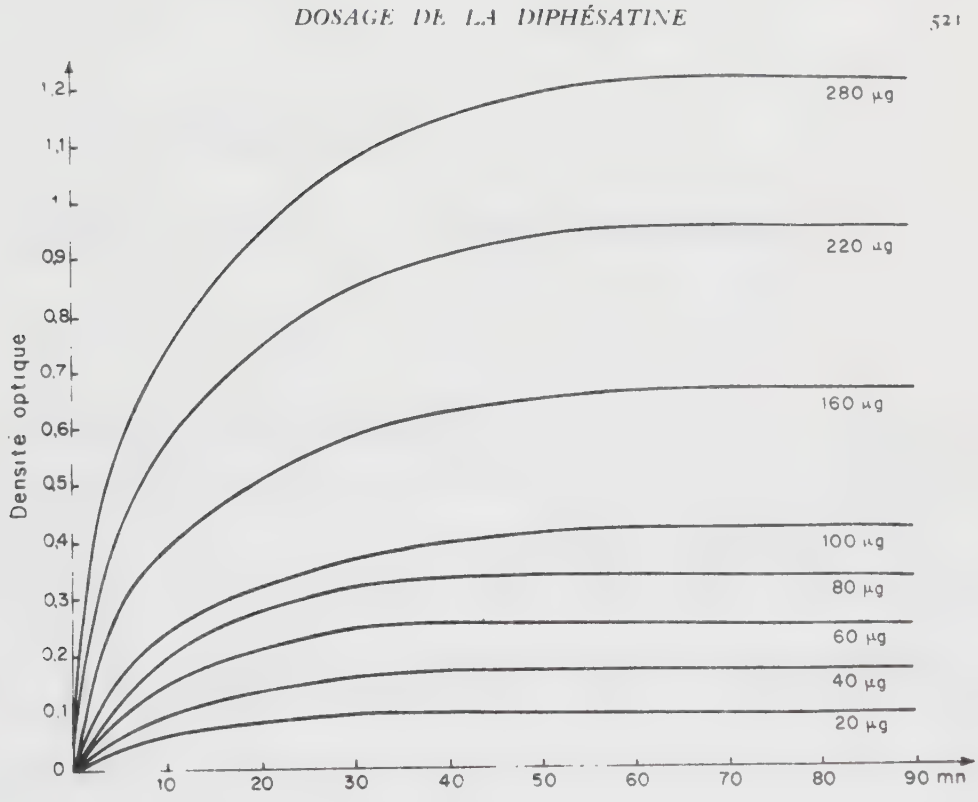


Fig. 5 — Influence de la concentration en diphésatine sur la cinétique de la réaction.

C - Technique proposée.

L'étude des paramètres de la réaction nous a donc conduit au protocole suivant :

1 - Réactifs :

Solution étalon de diphésatine à 40 µg/ml dans l'éthanol à 95^{c}.

Réactif oxydant : 1 ml de soude 10 N est complété à 100 ml avec une solution aqueuse de ferricyanure de potassium à 0,1 %.

2 - Mode opératoire :

-- Etablissement de la courbe d'étalonnage.

ml	Bl.	1	2	3	4	5	6	7	8
Sol. témoin de diphésatine	0	0,5	1	1,5	2	2,5	4	5,5	7
Ethanol à 95^{c}...	10	9,5	9	8,5	8	7,5	6	4,5	3
Eau distillée ..	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Réactif	5	5	5	5	5	5	5	5	5

-- Dosage de la diphésatine en solution pure.

La dilution de diphésatine est additionnée de 5 ml de réactif d'oxydation. Après agitation et repos à la température du laboratoire et à l'obscurité pendant un temps plus ou moins long, la lecture est effectuée à 570 nm.

Les résultats sont représentés sur la Figure 6.

-- Vérification de la loi de BEER-LAMBERT.

La cinétique de la réaction étant différente selon les concentrations en diphésatine, nous avons établi le temps de repos compatible avec la loi de BEER-LAMBERT en fonction des concentrations étudiées :

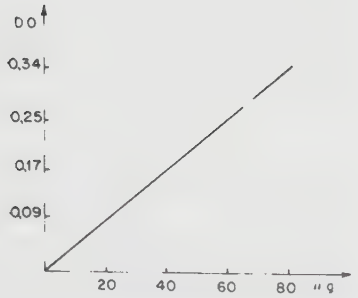
Pour des concentrations de 20 à 80 µg, la loi de BEER-LAMBERT est vérifiée au bout de 40 mn, temps au bout duquel le maximum d'intensité n'est pas atteint pour des concentrations supérieures.

Après 70 mn à l'obscurité, la loi de BEER-LAMBERT est vérifiée pour des concentrations de 20 à 280 µg de diphésatine dans le milieu réactionnel. (Figure 6).

II - DOSAGE DE LA DIPHESATINE DANS LE SIROP.

Le principal problème est posé par l'extraction de la diphésatine de ce milieu complexe. En effet, le sirop étudié possède le double inconvénient d'être coloré et de se présenter sous forme de suspension stabilisée par l'adjonction d'épaississants, l'expérience nous a montré qu'une extraction directe de la diphésatine par un solvant non miscible à l'eau, type chloroforme, n'est pas quantitative; de surcroît, le colorant vient souiller cette extraction.

Vérification de la loi de BEER-LAMBERT



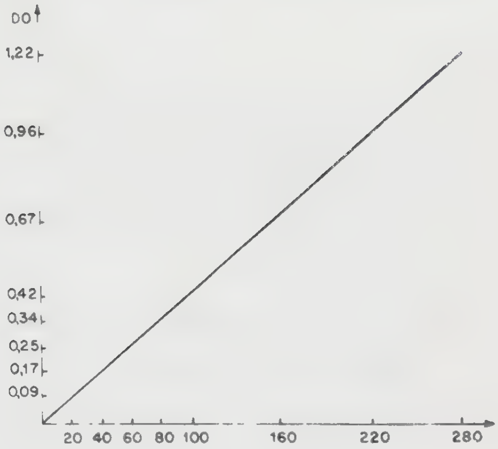


Fig. 6

Après 40 mn à l'obscurité

Après 70 mn à l'obscurité

Nous avons alors étudié les diverses possibilités qui s'offraient à nous selon les solubilités de la diphé-satine, indiquées dans le tableau suivant :

EAU	ALCOOL	CHLOROFORME	ETHER	ACETONE
0	++	++	0	+

A - Tentatives d'extraction.

Nous avons essayé tout d'abord une extraction alcoolique à partir du culot de centrifugation de la prise d'essai, desséché à l'étuve à 80° pendant 15 mn. Les résultats sont déficitaires.

Il en est de même après extraction chloroformique du culot de centrifugation et reprise du résidu d'évaporation par de l'éthanol à 95°.

Nous avons alors essayé d'éliminer l'eau par le sulfate de sodium anhydre ou la lévillite avant extraction chloroformique à chaud. Les résultats ne sont pas améliorés.

De plus, le colorant passe dans les solutions extractives, ce qui gêne considérablement la détermination colorimétrique.

Un traitement préalable du culot de centrifugation par l'éther, puis par l'eau, avant extraction alcoolique ou chloroformique en vue d'éliminer tout corps coloré, se révéla laborieux et aussi peu satisfaisant.

Dans ces conditions, nous avons remplacé l'alcool ou le chloroforme par l'acétone.

D'après nos essais, la diphésatine se dissout dans un mélange d'acétone et d'eau contenant au minimum trois parties d'acétone.

Après avoir effectué une dilution directe d'une partie de sirop dans neuf parties d'acétone, ce qui, à priori, solubilisait la diphésatine et avait l'avantage de floculer les épaississants, nous sommes parvenue à décolorer la solution par passage sur une colonne de Florisil (1).

---

(1) Florisil : Magnésia Silicagel Fluka.

Après examen au spectophotomètre, nous avons observé une importante erreur par excès, explicable par la présence de saccharose dont la quantité dans le sirop est quarante fois supérieure à celle de la diphésatine, et qui passe en proportion suffisante dans le mélange eau-acétone pour perturber le dosage.

Ce n'est qu'après élimination de l'eau par le sulfate de sodium que cette technique nous donna de bons résultats. Nous proposons dès lors le protocole opératoire ci-dessous :

B - Protocole opératoire.

1 - Extraction de la diphésatine et préparation de la solution à doser.

- Réactifs : Acétone R P
  Florisil
  Sulfate de sodium anhydre.

- Obtention d'une solution acétonique de diphésatine.

Après homogénéisation, on prélève exactement 5 ml de sirop et on rince la pipette avec 5 ml d'eau distillée. On mélange et on centrifuge à 4.000 t./mn pendant 15 mn. Le liquide surnageant est décanté; le culot est trituré avec du sulfate de sodium anhydre jusqu'à obtention d'une poudre fine qui est épuisée par 30, 2 x 20, puis 15 ml d'acétone. On porte le volume total à 100 ml.

La solution acétonique, rose, contient théoriquement 20 µg/ml de diphésatine.

- Décoloration de la solution acétonique.

On introduit un tampon de coton de verre au fond d'une burette de 1,5 cm de diamètre, puis le Florisil, en le tassant légèrement au fur et à mesure de son addition, de façon à obtenir une colonne d'absorption de 40 cm de hauteur. On verse la solution acétonique en réglant le débit de l'effluent à raison d'une goutte par seconde environ. On recueille un liquide incolore dont on rejette les premières fractions. Puis on en prélève 2 ml, qui contiennent, théoriquement, 40 µg de diphésatine. On laisse évaporer à température ordinaire.

2 - Dosage

On établit une gamme d'étalonnage comme précédemment, sur 20, 40, 60, 80 µg de diphésatine, à partir d'une solution témoin a 10 µg/ml. D'autre part, au résidu dévaporation des 2 ml de solution acétonique extractive, on ajoute successivement :

- 10 ml d'éthanol à 95^c (agiter)
- 5 ml d'eau distillée
- 5 ml de réactif au ferricyanure alcalin. (Mélanger).

On effectue les différentes lectures dans les conditions décrites plus haut.

C - Résultats.

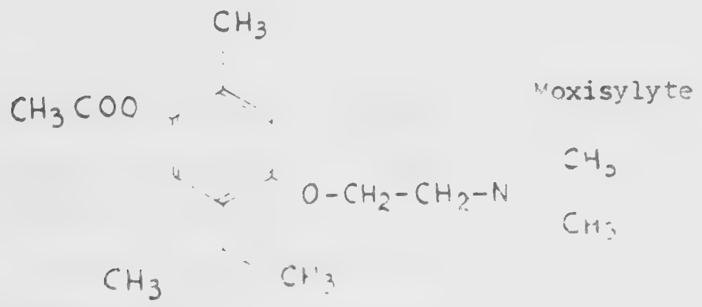
Les quantités de diphésatine trouvées lors des différents dosages sont comprises entre 0,038 g et 0,042 g pour 100 ml de sirop. La dispersion des résultats n'excède donc pas ± 5%.

CHAPITRE II

DOSAGE DU CITRATE DE MOXISYLYTE DANS UNE POMMADE.

Les études pharmacologiques effectuées sur certains éthers oxydes de l'hydroxy-3-p-cymène, ou thymol, ont révélé des propriétés sympatholytiques, antihistaminiques et spasmolytiques, particulièrement pour les éthers diéthylaminoethyliques (4), et dimethylaminoéthylique (24). Ultérieurement, l'acétoxy-6-β- diméthylaminoéthoxy-3-p-cymène, dénommé communément moxisylyte, se montra doué des mêmes propriétés et utilisable en thérapeutique comme sympatholytique majeur.

La moxisylyte base répond à la formule suivante :



Ce dérivé, préparé en 1954 par PAHLICKE (41), (42), a donné lieu par la suite à différents procédés de synthèse (5) (7) (9).

Il est utilisé sous forme de chlorhydrate, en dragées et suppositoires (11), et sous forme de citrate, en pommade.

Si l'analyse des premiers ne présente pas de difficultés,la seconde au contraire nous a posé différents problèmes.

Nous discuterons dans un premier temps l'identification et le dosage du moxisylyte, puis nous choisirons la méthode la mieux adaptée à la pommade.

La pommade étudiée répond à la formule ci-dessous :

Téfose 63 (1)	20 g
Labrafil M 2130 Cs (2)	5 g
Huile de Paraffine fluide	3 g
Eau permutée	63,9 g
Antifongique WL 1294 (3)	3 g
Lavande pure déterpénée (4)	0,1 g
Citrate de moxisylyte	3 g

---

(1) Le Téfose 63 est un mélange de monoesters et de diesters stéariques, d'éthylène glycol et de polyoxyéthylène glycol.

(2) Le Labrafil est constitué par des mélanges définis d'esters partiels mixtes de glycérols et de polyoxyéthylène glycols.

(3) L'antifongique est une solution d'hexachlorofène à 2 % dans l'éthylène glycol.

(4) La lavande pure déterpénée est une essence obtenue par distillation fractionnée et élimination de la fraction terpénique du produit d'entraînement à la vapeur d'eau des sommités fleuries de la lavande officinale. Son constituant principal est l'acétate de Linalyle.

I - IDENTIFICATION ET DOSAGE DU MOXISYLYTE.

La molécule comporte un noyau du p-cymène sur lequel sont greffées :

- une fonction ester-acétique
- une fonction éther-oxyde
- une fontion amine tertiaire.

Ces fonctions peuvent être mises à profit pour l'identification ou le dosage :

. Identification chromatographique comparable à celle des alcaloïdes; comme ces derniers, le moxisylyte se colore avec le réactif de DRAGGENDORF.

. Saponification de la fonction ester.

. Titrage de la fonction amine (anhydrotitrimétrie ou semimicrovolumétrie en phase hétérogène).

. D'autre part, le moxisylyte absorbe dans l'U.V.

A - Identification

-- Utilisant le caractère de base organique de la molécule : chromatographie en couches minces.

Elle est effectuée sur plaques de kieselgel G de 0,25 mm d'épaisseur, activées à 120° pendant 20 mn. Le mélange solvant utilisé est le butanol acétique, indiqué à la Pharmacopée Française, huitième éd. p. 1515; après migration sur 10 cm, les spots sont révélés par le réactif de DRAGGENDORF modifié par MUNIER et MACHEBOEUF.

Les solutions témoins sont à 1 mg/ml de citrate dans l'eau ou le chloroforme. Le sel est soluble dans ce dernier solvant à chaud. Dans ces conditions, on obtient dans les deux cas un spot orangé de Rf : 0,4.

-- Spectrophotométrie dans l'U.V.

Toutes nos mesures spectrophotométriques ont été effectuées avec un spectrophotomètre Unicam SP 800 en cuves de silice de 1 cm, contre un blanc comportant tous les composants de la pommade, à l'exclusion du principe actif. Le blanc et la pommade sont traités de façon identique.

Le citrate de moxisylyte possède dans l'ultraviolet un spectre présentant deux maxima, l'un à 205 nm, l'autre à 277 nm. (Figure 7).

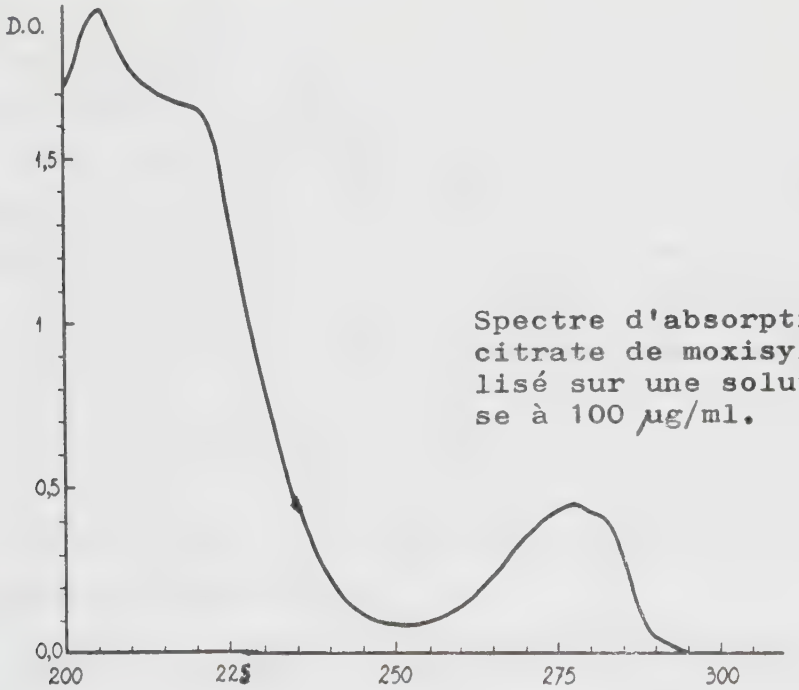


Fig. 7

B - <u>Dosage</u>

1 - <u>Dosages utilisant le caractère basique de la molécule</u>.

- Anhydrotitrimétrie.

Le moxisylyte est une base assez forte pour être dosée dans l'acide acétique par l'acide perchlorique 0,1 N en présence de crital violet, qui vire en milieu fortement acide.

1 ml CLO_4 H 0,1 N = 0,03156 g de chlorhydrate de moxisylyte.
= 0,04715 g de citrate de moxisylyte.

- Dosage semimicrovolumétrique, utilisant le lauryl sulfate de sodium (L.S.Na).

Cette méthode, mise au point par PELLERIN et COLL. (43) (44) (45), et appliquée à de nombreuses bases organiques, réside dans la formation en proportions stoechiométriques et en milieu biphasique d'un laurylsulfate de base organique extractible par un solvant organique non miscible au milieu aqueux réactionnel; un léger excès de L.S. Na se combine à un colorant basique présent dans la phase organique, tel que le jaune de méthyle,et provoque son changement de coloration dans cette même phase.

- 1 ml de L.S. Na 0,01 M correspond à 0,00315 mg de chlorhydrate de moxisylyte;
- 1 ml de L.S. Na 0,01 M correspond à 0,00471 mg de citrate de moxisylyte.

2 - Spectrophotométrie en U.V.

Le maximum d'absorption à 277 nm peut être utilisé en vue d'un dosage; la loi de BEER-LAMBERT est vérifiée :

$E_{1\ cm}^{1\ \%}$ = 45 pour le citrate de moxisylyte en solution aqueuse.

$E_{1\ cm}^{1\ \%}$ = 70 pour le chlorhydrate de moxisylyte en solution aqueuse.

II - APPLICATION DE CES METHODES A LA POMMADE.

Il s'agit donc d'une émulsion contenant un fort pourcentage d'eau; nous avons d'emblée éliminé l'anhydrotitrimétrie ne retenant à priori que les méthodes spectrophotométrique et semimicrovolumétrique.

L'expérience nous a montré que seule la méthode semimicrovolumétrique est possible au point de vue quantitatif dans ce cas particulier, mais comme elle n'est pas spécifique, nous l'avons complétée par une identification rigoureuse du principe actif.

Nous rapporterons d'abord nos essais relatifs à la spectrophotométrie.

A - Essai de dosage spectrophotométrique en U.V.

- Extraction du moxisylyte.

La méthode n'est valable qu'après extraction du moxisylyte. Nous avons d'abord déterminé les caractères de solubilité des différents composants de la pommade.

	EAU	METHANOL ETHANOL	CHLOROFORME	HEXANE	PYRIDINE	HUILES VEGETALES
TEFOSE	insol.	sol.	sol.	insol.	sol.	sol.
LABRAFIL	Dispersable à chaud	assez sol.	sol.	insol.	sol.	sol.
LAVANDE	insol.	sol.	sol.	sol.	sol.	sol.
CITRATE DE MOXISYLYTE	sol.	sol.	sol. à chaud	insol.	sol.	insol.

- Par conséquent, le citrate de moxisylyte peut être séparé théoriquement par extraction aqueuse. Nous pensions que le Labrafil, tenu en suspension et rendant la solution opaque, pourrait être éliminé par refroidissement de la solution. Mais le passage à une température de 0^{o} s'est révélé inopérant.

- Une solution chloroformique de la pommade présente un aspect laiteux dû à la présence d'une forte proportion d'eau que nous avons tenté d'éliminer par passage à l'étuve, soit directement, soit après trituration avec de l'alumine; ce dernier procédé présente à priori l'avantage de faciliter l'extraction par division de l'échantillon.

Les solutions obtenues sont effectivement limpides. Mais les mesures spectrophotométriques ont toujours donné des résultats déficitaires, de 25 % en moyenne.

- Le chloroforme a été remplacé par le méthanol. Après trituration de la pommade avec de l'alumine et déshydratation à l'étuve, le mélange est centrifugé ou filtré. Les résultats sont toujours aussi peu satisfaisants.

En conséquence, la méthode spectrophotométrique a été abandonnée.

B - Dosage par semimicrovolumétrie.

Devant cette série d'échecs, nous avons eu recours à la semimicrovolumétrie.

L'ensemble des constitutants de la pommade étant soluble, soit dans l'eau (citrate de moxisylyte), soit dans le chloroforme (excipients et, partiellement, citrate de moxisylyte), cette technique semble à priori convenable, dans la mesure où les excipients ne consomment pas de réactif.

Tous les dosages effectués ont été pratiqués parallèlement sur la pommade et sur une préparation identique ne contenant pas de citrate de moxisylyte.

- Par traitement à froid avec des volumes égaux de chloroforme et d'eau, les résultats sont déficitaires.

- Une déshydratation préalable, soit par passage à l'étuve soit par l'alumine, la lévillite ou un gel de silice, n'apporte guère d'amélioration.

- Par contre, les résultats sont valables si la pommade déshydratée est dissoute dans du chloroforme à l'ébullition. Un traitement indentique du "placebo" a montré que les excipients n'interfèrent pas.

1 - Technique du dosage.

On pèse 1 g de pommade sur un papier glacé que l'on porte à l'étuve à 90°. Le papier et la pommade son ensuite introduits dans un ballon avec 90 ml de chloroforme. On porte à ébullition sous reflux pendant 20 mn. On obtient ainsi une solution contenant théoriquement 0,03 g de citrate de moxisylyte.

On ajoute, après refroidissement, 90 ml d'eau distillée et 5 ml de solution acido-alcoolique de jaune de méthyle.

On titre par le lauryl sulfate de sodium 0,01 M, jusqu'à virage au rose de la phase chloroformique.

2 - Résultats.

Valeurs moyennes trouvées :

VALEUR THEORIQUE	VALEUR MOYENNE TROUVEE
30 mg	29,75 mg

l'erreur n'atteint pas 1 %

C - <u>Identification du moxisylyte dans la pommade</u>.

Ayant dû adopter une méthode dedosage du moxisylyte non spécifique, nous avons jugé nécessaire d'identifier le principe actif.

La pommade est traitée comme il vient d'être dit, en utilisant 30 ml de chloroforme au lieu de 90 ml. La solution obtenue contient donc 1 mg/ml de citrate de moxisylyte.

On opère de la même façon avec une pommade sans moxisylyte.

La solution témoin est une solution chloroformique de même concentration.

Par chromatographie de ces trois solutions, on observe les spots suivants :

-. Citrate de moxisylyte :

Un spot orangé de Rf : 0,4

-. Préparation sans citrate de moxisylyte :
Un spot orangé de Rf : 0,2 et une légère traînée orangée du point de départ au front du solvant.

-. Pommade :
Un spot orangé de Rf : 0,2,
Un spot orangé de Rf : 0,4, et une légère traînée orangée du point de départ au front du solvant.

---x---

D E U X I E M E   P A R T I E

PROBLEMES POSES PAR LES INTERFERENCES ENTRE DEUX OU PLUSIEURS PRINCIPES ACTIFS

La complexité des mélanges médicamenteux peut être à l'origine de réactions imprévues entre les constituants. La caractérisation et le dosage sont souvent perturbés, ce qui entraîne des problèmes d'extraction et de séparation.

Nous prendrons deux exemples :

- Le dosage de la vitamine PP dans un médicament polyvitaminé.
- Le dosage de l'acide citrique en présence d'acide tartrique.

---=---

CHAPITRE I

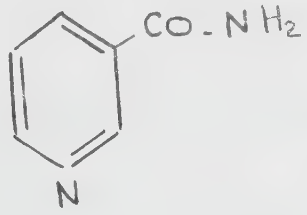
DOSAGE DE LA VITAMINE PP DANS UN MEDICAMENT POLYVITAMINE.

La vitamine PP ou Nicotinamide figure dans de nombreuses formules polyvitaminées. Les auteurs sont unanimes à reconnaître la difficulté de son dosage; les autres vitamines, même en faible quantité, interfèrent dans les méthodes spectrophotométrique , photométrique ou polarographique.

Nous avons analysé des comprimés répondant à la formule :

Chlorhydrate de thiamine	15 mg
Chlorhydrate de riboflavine	15 mg
Nicotinamide	50 mg
Pantothénate de calcium	25 mg
Chlorhydrate de pyridoxine	10 mg

Excipient Q.S.P. un comprimé dragéifié



NICOTINAMIDE

I - DOSAGE DU NICOTINAMIDE PUR.

Les méthodes les plus utilisées sont : la réaction de KOENIG (19) (38), la spectrophotométrie U.V., l'hydrolyse.

- Application de la réaction de KOENIG.

L'amide nicotinique réagit avec le bromure de cyanogène pour former un sel de pyridinium, qui après condensation avec les amines aromatiques,donne naissace à un composé coloré, se prêtant à un dosage colorimétrique.

- Spectrophotométrie U.V.

La vitamine PP présente un spectre d'absorption dont le maximum est situé à 260 nm. (Figure 8).

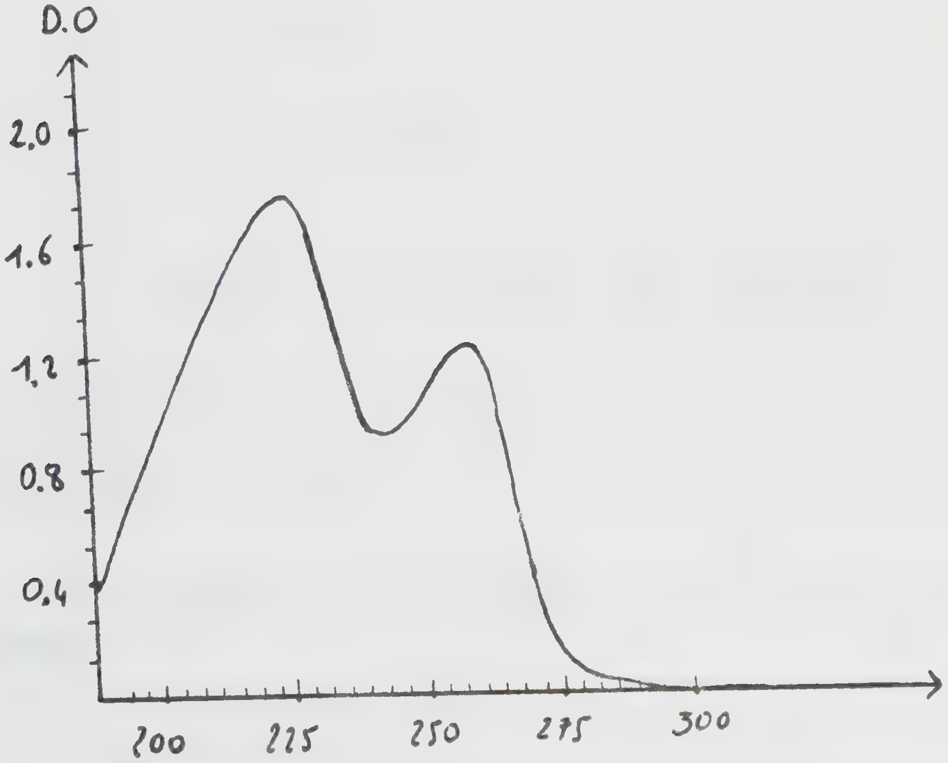


Fig. 8 Spectre du nicotinamide en solution aqueuse à 50µg/ml.

II - DOSAGE DU NICOTINAMIDE DANS LE MEDICAMENT.

A - Essai de dosage direct.

La réaction de KOENIG et la spectrophotométrie sont gênées par la présence des autres vitamines, mais l'hydrolyse permet théoriquement d'opérer sans séparation préalable du nicotinamide.

Elle est réalisée par chauffage à l'ébullition au reflux d'une prise d'essai contenant 25 mg de nicotinamide en présence d'acide sulfurique 1 M pendant 1 heure.

Après alcalinisation par une solution tampon boratée à ph. 9, et distillation, l'ammoniaque est titrée par une solution 0,01 M d'acide sulfurique : 1 ml $H_2 SO_4$ 0,01 M correspond à 2,442 mg de nicotinamide.

Les résultats sont excédentaires.

D'autre part, la distillation est gênée par une mousse abondante. Le dosage direct a donc été abandonné.

B - Dosage du nicotinamide après extraction.

La séparation préalable du nicotinamide devrait rendre possible l'application des méthodes colorimétriques et spectrophotométriques.

1 - Méthode colorimétrique: application de la réaction KOENIG.

Le nicotinamide est extrait par le chloroforme dans lequel les autres composants sont insolubles.

La solution chloroformique est filtrée et évaporée, la réaction de KOENIG est pratiquée sur la solution aqueuse du résidu.

Les résultats excédentaires d'une part, la coloration jaune du résidu d'évaporation d'autre part, confirment la présence de traces de riboflavine.

Nous les avons éliminées par chromatographie de la solution chloroformique sur colonne de talc selon la technique de STAINIER et LAPIERE (49).

La réaction de KOENIG conduit alors à des résultats déficitaires, de 10 % en moyenne.

En définitive,la méthode s'est révélée imprécise, et de plus, longue et délicate; nous ne l'avons donc pas retenue.

2 - Méthode spectrophotométrique dans l'U.V.

-- Essais de séparation du nicotinamide.

Nous avons essayé diverses séparations chromatographiques, en vue d'un dosage spectrophotométrique.

- Nous avons d'abord eu recours à une résine échangeuse d'ions à base d'alginate de sodium (18). La difficulté d'obtention d'un alginate en poudre suffisamment fine et homogène nous a fait renoncer à ce procédé.

- Nous nous sommes ensuite orientée vers la chromatographie sur papier, appliquée par RANSY (53) à un médicament de composition qualitativement identique à celui que nous voulions analyser.

Nous avons pratiqué une chromatographie circulaire avec le mélange solvant butanol saturé d'eau; les spots des vitamines B_2 et B_6 sont révélés par fluorescence, ceux des vitamines B_1 et PP par l'acide phosphomolybdique.

La migration de la vitamine PP étant très voisine de celle de la vitamine B_6, nous n'avons pas jugé bon de poursuivre nos essais. (Figure 9).

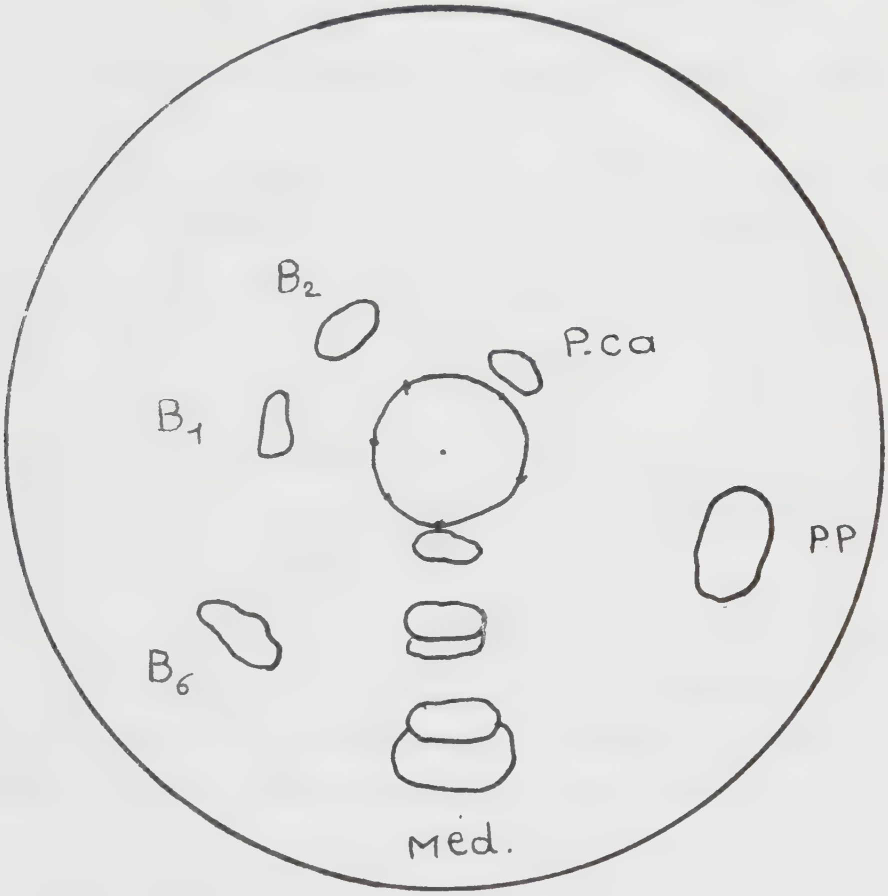


Fig. 9 -Chromatographie circulaire sur papier.
Solvant : butanol saturé d'eau
Solutions aqueuses des vitamines B_1, B_6, PP, et du pantothénate de calcium à 1 mg/ml.
Solution de vitamine B_2 dans l'acide sulfurique au 8è à 0,5 mg/ml.

- Nous avons retenu en définitive la chromatographie en couche mince.

Préparation des plaques :

30 g de kieselgel GF 254 sont mélangés à 60 ml d'eau. La suspension est étendue sur une épaisseur de 0,5 mm. Les plaques sont activées par passage à l'étuve à 120° pendant 20 mn.

Plusieurs mélanges solvants ont été essayés :

(I) Butanol - Méthanol - Acide acétique - Eau (4 : 4 : 1 : 2).

(II) Méthylisobutylcétone - Méthanol - Acide acétique Chloroforme (3 : 2 : 1 : 14). (33).

(III) Acide acétique - Acétone - Méthanol - Benzène (5 : 20 : 70). (21).

Avec (I), la séparation des vitamines B_2, B_6, et PP est mauvaise, ce qui rend pratiquement impossible une élution quantitative ultérieure.

(II) est préférable (Figure 10). Mais si le nicotinamide est bien séparé des autres constituants, les vitamines B_2 et B_6 ont pratiquement le même Rf ainsi que la vitamine B_1 et le pantothénate de calcium.

C'est finalement (III) que nous préfèrons, car il nous a permis non seulement une bonne séparation de la vitamine PP, mais encore une identification parfaite de tous les composants du médicament. (Figure 11).

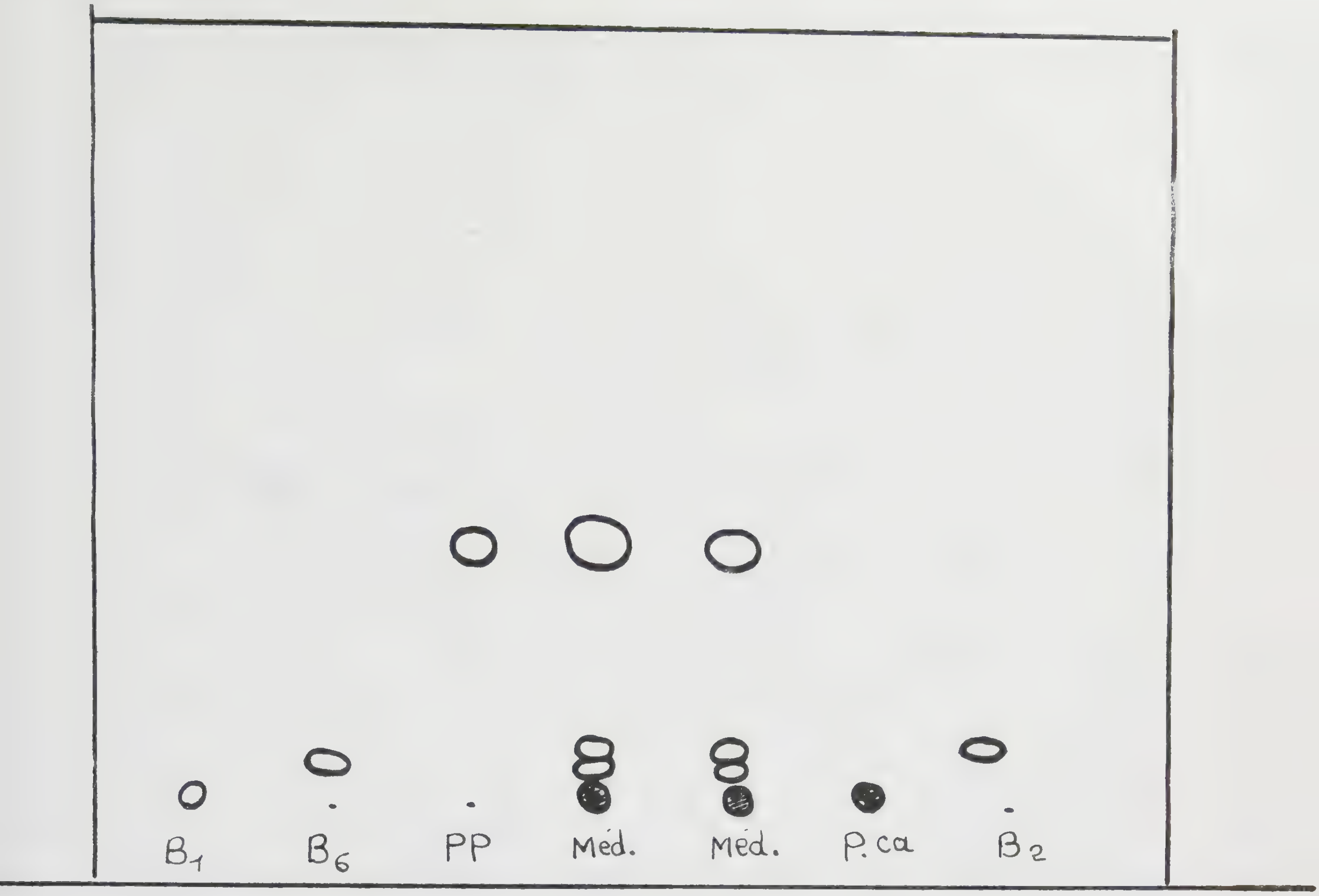


Fig. 10 - Solutions aqueuses de vitamines à 1 mg/ml
Prise d'essai médicamenteuse : 3 comprimés/50 ml.

Les spots sont révélés en lumière de WOOD :

- extinction de fluorescence pour les vitamines B_1, B_6, PP, à 254 nm.

- Fluorescence jaune vif pour la riboflavine, à 365 nm.

- Le spot de pantothénate de calcium est révélé par pulvérisation d'une solution alcoolique de ninhydrine à 1%.

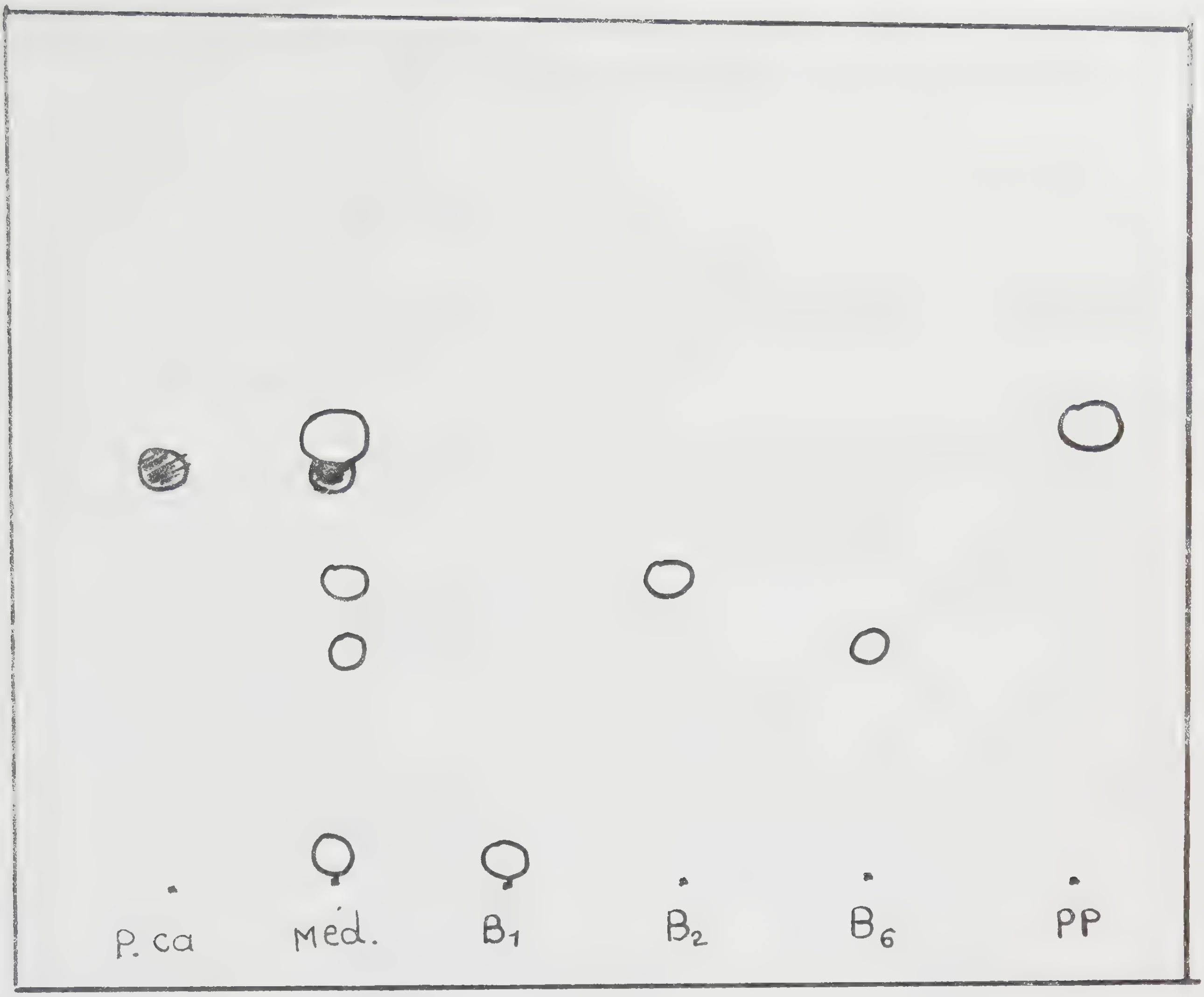


Fig. 11 - Solutions aqueuses des vitamines B_1, B_6 et du pantothénate de calcium à 1 mg/ml.
Solution aqueuse de vitamine PP à 6 mg/ml.
Solution de vitamine B_2 dans l'acide sulfurique au 8è à 0,5 mg/ml.

3 - DOSAGE DU NICOTINAMIDE DANS LES COMPRIMES.

a - Principe.

Les essais que nous venons de décrire nous ont permis d'adopter une méthode satisfaisante de dosage de la vitamine PP :

Le nicotinamide est séparé par chromatographie sur couche mince. Les spots sont élués par un solvant approprié. On dose par spectrophotométrie.

b - Protocole opératoire.

- Réactifs :

Solution aqueuse étalon de vitamine PP à 6 mg/ml
Kieselgel GF 254
Acide acétique cristallisable
Acétone RP
Méthanol RP
Benzène RP

- Technique :

° Préparation de la solution à doser :

3 dragées sont débarassées de leur couche colorée par lavage sous un courant d'eau. Après pulvérisation au mortier, elles sont traitées par deux fois 20 ml d'eau distillée. La solution est filtrée ou centrifugée; on complète son volume à 50 ml avec le même solvant. Elle contient théoriquement 3 mg/ml de vitamine PP.

° Mélange solvant utilisé :

Acide acétique	5 p
Acétone	5 p
Méthanol	20 p
Benzène	70 p

° Séparation chromatographique.

On dépose successivement :

- 5 µl, 10 µl, 15 µl d'une solution aqueuse de nocotinamide de référence à 6 mg/ml, soit respectivement 30, 60, 90 µg.
- 20 µl de la solution obtenue à partir de 3 dragées, soit théoriquement 60 µg de nicotinamide.

Après migration sur 12 cm, les plaques sont examinées en lumière de WOOD, à 254 nm.

° Elution et dosage.

Après avoir déterminé l'emplacement des différents spots, la surface de gel correspondante est prélevée par grattage à l'aide d'une spatule, et recueillie dans des tubes à centrifuger. Dans chacun d'eux sont ajoutés 5 ml d'eau distillée.

On centrifuge à 5.000 t/mn pendant 10 mn.

Le dosage spectrophotométrique est effectué sur le liquide surnageant pour chaque éluat, sous 1 cm à 260 nm, contre un blanc obtenu dans les mêmes conditions à partir d'une petite surface de gel seul.

c - Résultats.

Après avoir tracé la courbe d'étalonnage avec les éluats témoins, on déduit la concentration en nicotinamide de l'extracté puis des dragées.

L'erreur n'excède pas ± 5 %. (Figure 12).

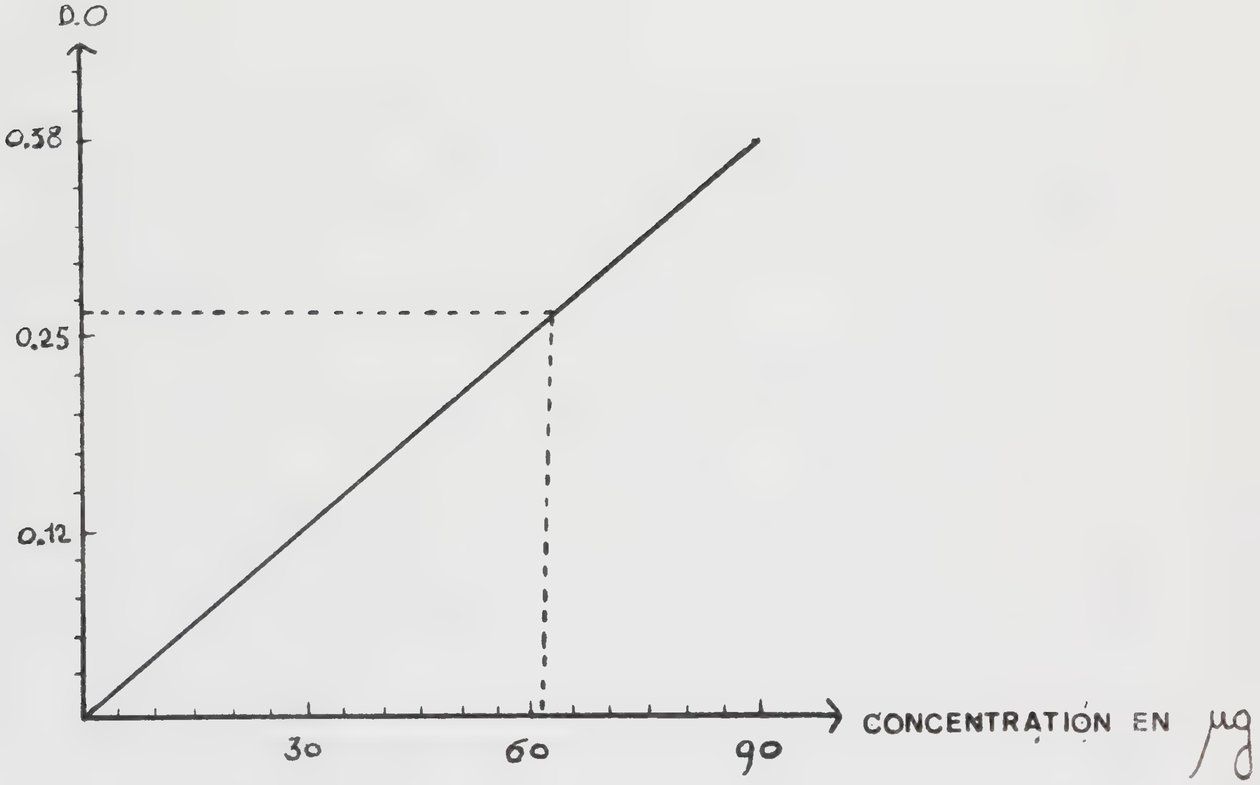


Fig.12 - Dosage spectrophotométrique du nicotinamide.

CHAPITRE II

DOSAGE DE L'ACIDE CITRIQUE EN PRESENCE D'ACIDE TARTRIQUE.

Un autre exemple d'interférence entre plusieurs principes actifs est fourni par un granulé effervescent contenant à la fois de l'acide citrique et l'acide tartrique, acides alcools dont les réactions analytiques sont très voisines et souvent identiques.

La formule du médicament est la suivante :

Citrate monosodique	1 g
Chlorure d'ammonium	2 g
Chlorure de magnésium	1 g
Sulfate de sodium anhydre	2 g
Acide citrique	11 g
Acide tartrique	32,5 g
Bicarbonate de sodium	50,5 g

Il s'agit donc de doser l'acide citrique libre dans ce médicament, en même temps que l'acide à l'état de citrate monosodique. Nous discuterons d'abord les différentes possibilités analytiques relatives à cet acide et nous choisirons celle qui convient le mieux en présence d'acide tartrique.

I - DOSAGE DE L'ACIDE CITRIQUE PUR.

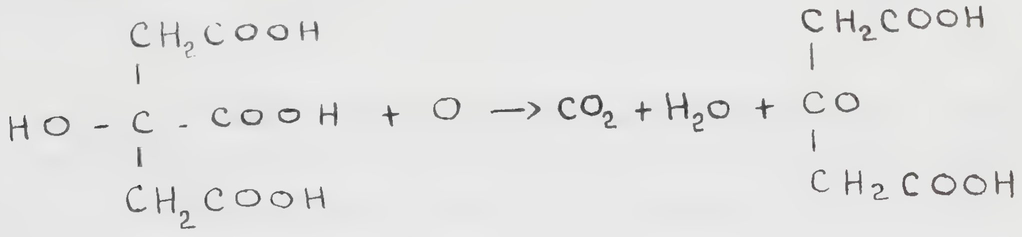
Travaux antérieurs.

La détermination de l'acide citrique dans les médicaments ou les milieux biologiques, a fait l'objet de nombreux travaux. Elle peut être réalisée par des méthodes chimiques ou des méthodes biochimiques.

- Méthodes chimiques.

Les méthodes chimiques sont basées sur l'oxydation de l'acide citrique au niveau du groupe HO-C-COOH.

. DENIGES (16) utilise la formation de l'acide acétone-dicarboxylique qu'il dose par son réactif au sulfate mercurique acide.



. STAHRE (50), KOGAN (28), BACKSTROM (1), oxydent l'acide citrique en acétone, que le premier transforme en pentabromacétone, dosé colorimétriquement après extraction (*) tandis que le second met à profit la formation d'iodoforme, et que le troisième fait agir le vanillal en milieu alcalin.

. GORDON (23) effectue un dosage spectrophotométrique du complexe ferrique formé avec l'acide citrique en milieu acide.

(*) méthode reprise par différents auteurs (2), (40), (47).

. L'une des méthodes les plus classiques de dosage a été mise au point par FURTH et HERMANN (22): dosage colorimétrique après condensation de l'anhydride citraconique, obtenu par action de l'anhydride acétique sur l'acide citrique, avec la présence de pyridine.

- Méthodes enzymatiques.

La spécificité de ces méthodes (19), (15), (39), (51) est supérieure à celle des méthodes précédentes. Elles permettent surtout de déterminer des quantités très faibles d'acide citrique, de l'ordre de 0,2 µg.

Travaux personnels.

A - Choix de la méthode.

Nous avons d'emblée éliminé les méthodes enzymatiques, utiles surtout en biologie.

Parmi les méthodes chimiques, la réaction à la pentabromacétone paraît être la plus précise et la plus spécifique, mais elle est longue, malgré les simplifications proposées par différents auteurs.

Nous avons porté notre choix sur une méthode dérivée de la réaction de FURTH et HERMANN.

B - Etude de la réaction de FURTH et HERMANN.

Nos mesures ont été effectuées sur un spectrophotomètre Unicam SP 600, en cuves de 1 cm.

La technique proposée par MARIET et BOULET (32), et que nous avons appliqué en premier lieu conduit à une coloration stable pendant 5 mn environ, le maximum étant atteint après 30 mn de chauffage à 32 °.

En vue d'améliorer la cinétique et la durée de stabilité, nous avons précisé les points suivants concernant le développement de la coloration :

- Influence de la température.
- Influence de la concentration en eau dans le milieu réactionnel final.
- L'allure spectrale de la réaction colorée et la vérification de la loi de BEER-LAMBERT ont été ensuite établies.

1 - <u>Influence de la température.</u>

- A 1 ml de solution aqueuse contenant 200 µg d'acide citrique, on ajoute :

1,5 ml de pyridine
6 ml d'anhydride acétique.

- Après chauffage au bain-marie à 60° pendant 10 mn, l'intensité de la coloration est très importante, mais sa stabilité est faible.

- A la température de 40° après chauffage de 30 mn, l'intensité de la coloration est inférieure, mais la stabilité est de 5 mn, environ; la reproductibilité est convenable.

- Les résultats ont été sensiblement identiques par chauffage à 32° pendant 30 mn.

- L'addition d'anhydride acétique rendant la réaction très exothermique, nous avons reproduit tous ces essais dans des tubes refroidis par un bain de glace, puis placés dans les différents bains-maries. Les meilleurs résultats ont été obtenus la encore après chauffage à 40°. La coloration atteint son maximum au bout de 20 mn et reste constante pendant 40 mn. Ce maximum est cependant nettement inférieur à celui obtenu sans refroidissement (Figure 13).

2 - Influence de la concentration en eau.

Pour des concentrations en eau supérieures à 17 % dans le milieu réactionnel final, en présence de 100 à 400 µg d'acide citrique, la coloration n'est pas stable; son intensité est diminuée, la cinétique n'est plus la même pour les différentes concentrations en acide citrique.

3 - Spectre d'absorption.

Dans les conditions opératoires qui viennent d'être décrites, le maximum d'absorption est situé à 405 nm, et non à 420 nm comme l'indiquent MARIET et BOULET. (Figure 14).

4 - Vérification de la loi de BEER-LAMBERT.

La loi de BEER-LAMBERT est vérifiée pour des concentrations variant entre 100 et 400 µg d'acide citrique pur. (Figure 15)

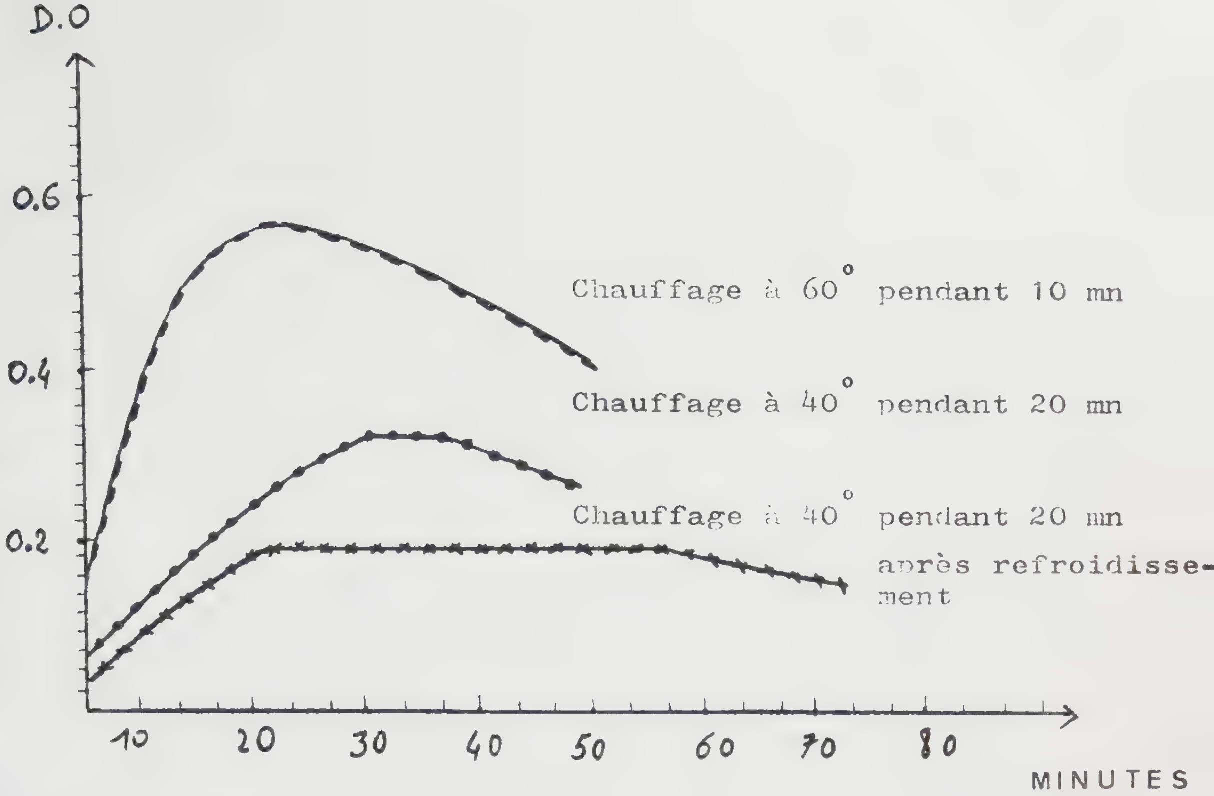


Fig. 13 - Influence de la température: essais réalisés sur une solution aqueuse d'acide citrique à 200 µg/ml.

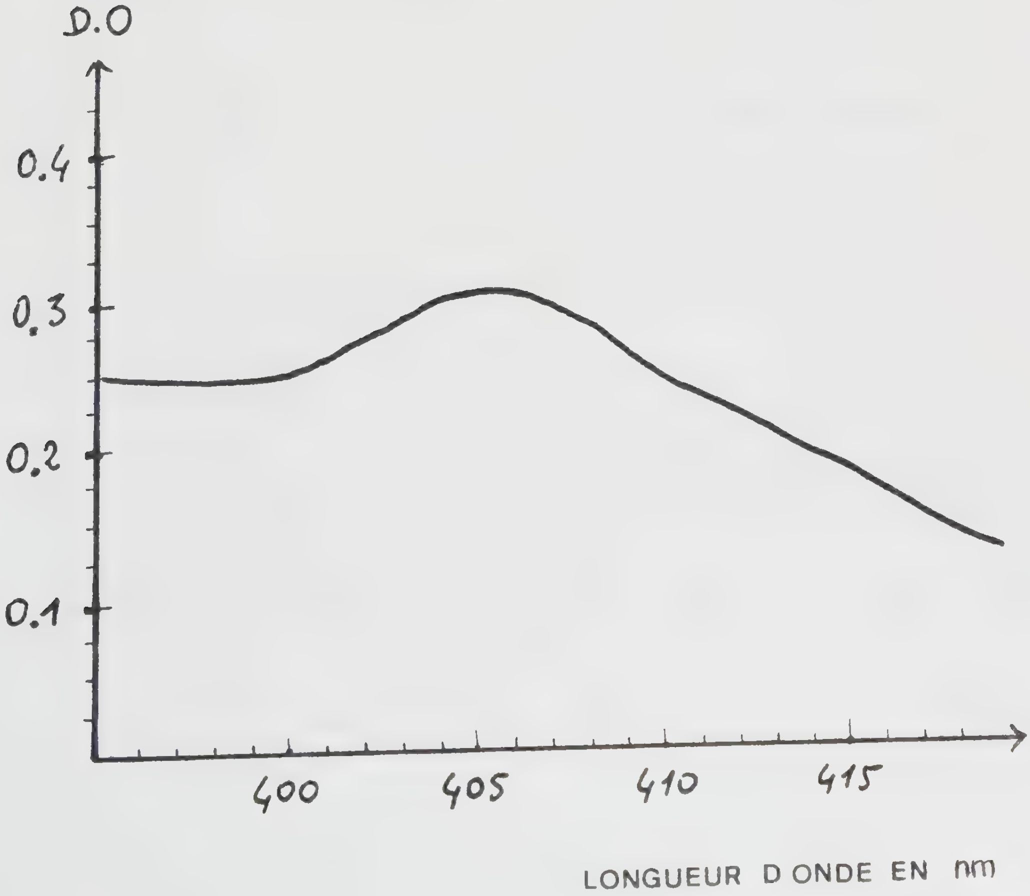


Fig. 14 - Spectre d'absorption.

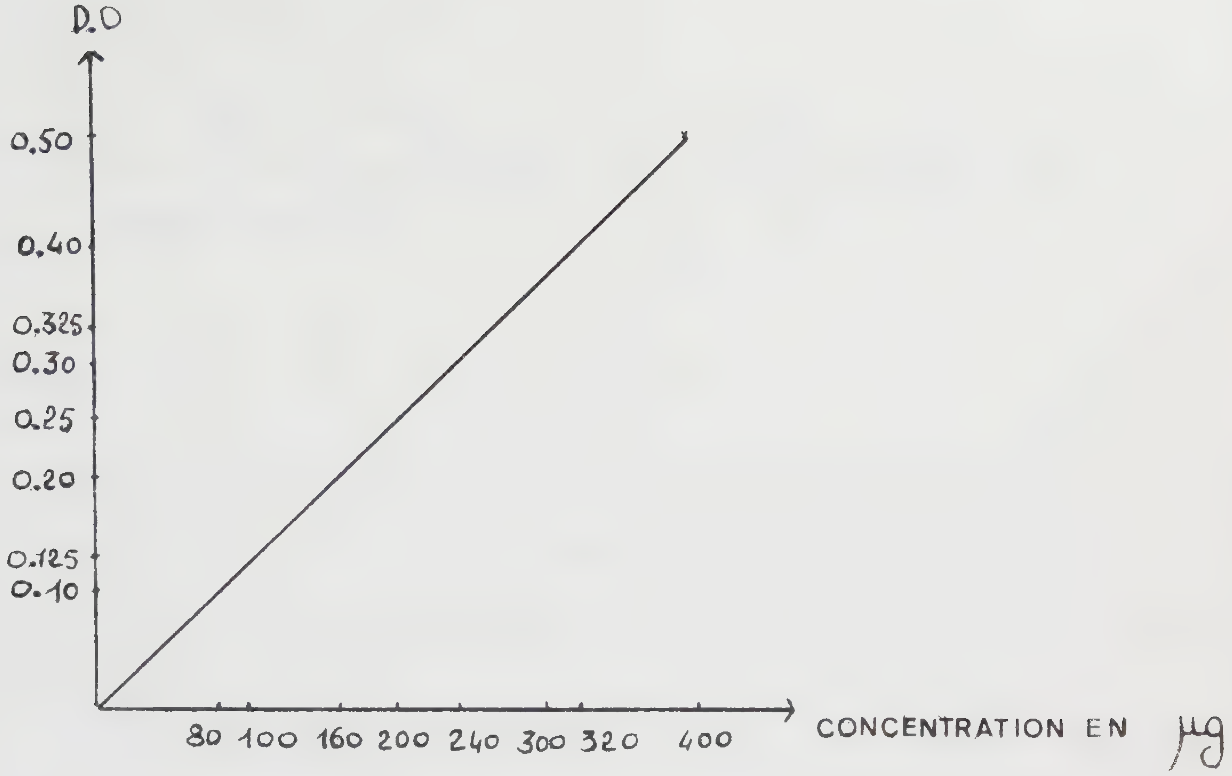


Fig. 15 - Vérification de la loi de BEER-LAMBERT.

C - <u>Technique proposée</u>.

- <u>Réactifs</u>.

. Solution aqueuse étalon d'acide citrique à 400 µg/ml.
. Pyridine R.P.
. Anhydride acétique R.P.

- <u>Mode opératoire</u>.

. Etalonnage.

Dans 5 tubes à essai, placés dans un bain de glace, on introduit les réactifs comme il est indiqué dans le tableau suivant :

	BLANC	1	2	3	4
SOLUTION ETALON	0	0,25	0,5	0,75	1
EAU DISTILLEE	1	0,75	0,5	0,25	0
PYRIDINE	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
ANHYDRIDE ACETIQUE	6	6	6	6	6
CONCENTRATIONS en µg	0	100	200	300	400

. La lecture est effectuée à 405 nm après chauffage au bain-marie à 40° pendant 20 mn.

Les résultats sont représentés Figure 16 .

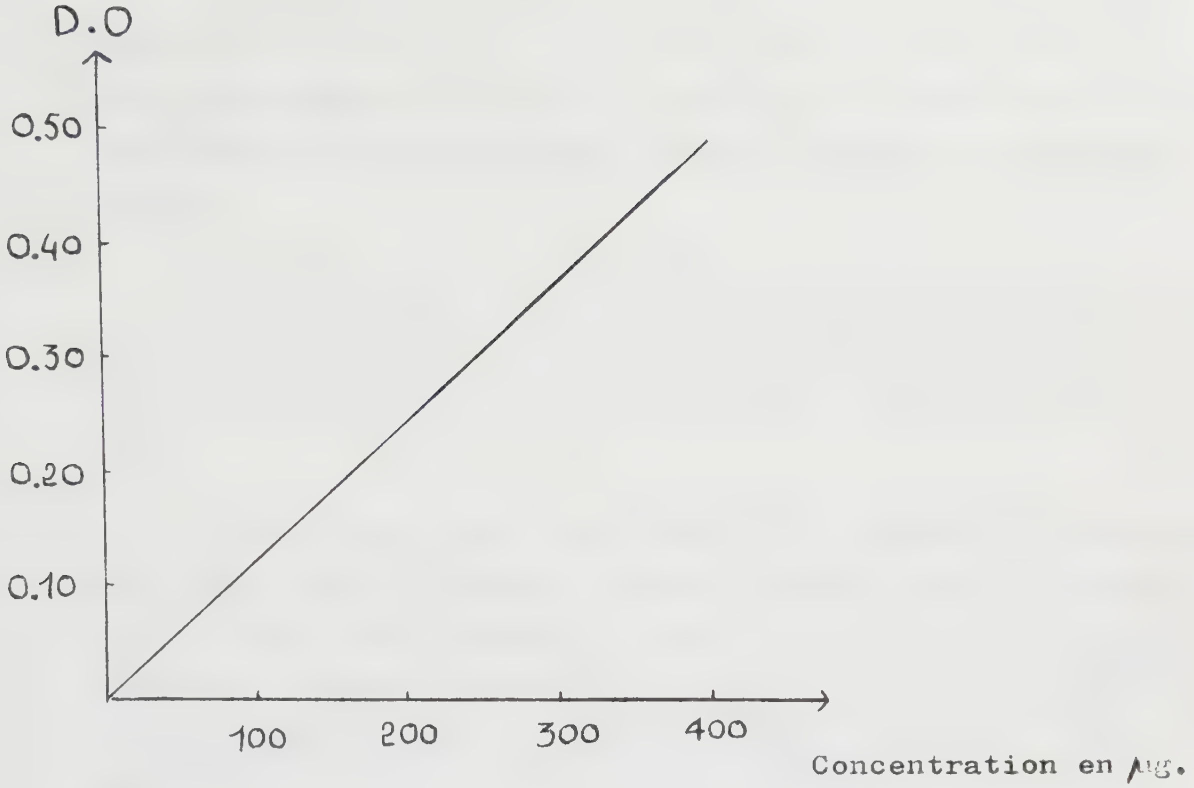


Fig. 16

II - DOSAGE DE L'ACIDE CITRIQUE EN PRESENCE D'ACIDE TARTRIQUE.

L'acide tartrique donne lui aussi une coloration avec l'anhydride acétique et la pyridine, mais à des concentrations supérieures à celles dans lesquelles il se trouve dans le médicament. Nous avions supposé que sa présence ne serait pas gênante. Mais, mélangé à l'acide citrique, il participe au développement de la coloration. Aussi les résultats sont-ils excédentaires.

Il est donc obligatoire de séparer les deux acides.

A - Séparation de l'acide citrique.

Les solubilités des deux acides étant pratiquement identiques, nous nous sommes orientée vers des réactions de précipitation de l'acide tartrique. Il reste une solution contenant l'acide citrique libre et l'acide citrique du citrate.

La formation de tartrate de cuivre et la titration de l'acide citrique resté en solution par une solution normale d'hydroxyde de sodium n'aboutit à aucun résultat valable.

Nous avons alors mis à profit le minimum de solubilité dans l'eau du tartrate acide de potassium à pH voisin de 3,4 ; nous avons précipité l'acide tartrique sous forme de tartrate acide de potassium (crème de tartre) par addition d'une solution tampon d'acétate de potassium acétique (11), le pH étant mesuré potentiométriquement.

Alors que cette technique est convenable pour le produit pur, la précipitation de l'acide tartrique à partir du médicament n'est possible qu'en milieu hydro-alcoolique.

Après filtration (ou centrifugation) et dilution, le dosage de l'acide citrique par la méthode de MARIET et BOULET s'est révélé déficitaire. L'alcool diminue en effet l'intensité de la coloration. C'est pourquoi nous avons ajouté dans tous les tubes contenant la solution étalon d'acide citrique une quantité d'éthanol à 95^{c} égale à celle contenue dans le tube du dosage (0,2 ml pour 1 ml de solution aqueuse.)

Nous avons vérifié que la cinétique de la réaction et la stabilité de la coloration sont identiques à celles que nous avons établi en milieu aqueux.

B - Protocole opératoire.

1 - Isolement de l'acide citrique.

Solution à étudier : 1 g de granulés est dissout dans 25 ml d'eau distillée.

- Réactifs :

Solution aqueuse d'acétate de potassium à 20 %
Acide acétique pur R.P.
Ethanol à 95^c

- Technique :

Dans un erlenmeyer on dissout, dans 25 ml d'eau environ, 1 g de médicament, ce qui correspond à 0,II95 g d'acide citrique (0,II0 g d'acide citrique libre, et 0,0095 g d'acide correspondant à 0,0I0 g de citrate monosodique).

On ajoute 2 ml de solution d'acétate de potassium et, lentement, 2 ml d'acide acétique.

Après agitation pendant 5 mn, pour favoriser et accélérer la formation de crème de tartre, on ajoute 80 ml d'éthanol à 95^c, lentement, en agitant.

On laisse au repos pendant 30 mn environ, puis on filtre. Le filtrat est recueilli dans un ballon jaugé de 200 ml.

On lave le précipité et le filtre avec 3 fois IO ml d'alcool, et on complète à 200 ml avec de l'eau distillée.

20 ml de cette solution sont complétés à 50 ml avec de l'eau distillée. On obtient ainsi une solution contenant théoriquement 239 µg/ml d'acide citrique total.

2 - Dosage de l'acide citrique.

- Courbe d'étalonnage.

Dans tous les tubes placés dans un bain de glace, on ajoute successivement les réactifs suivants :

	BLANC	1	2	3	4	X
SOLUTION ETALON	0 ml	0,2	0,4	0,6	0,8	0
SOLUTION A ETUDIER	0 ml	0	0	0	0	1
EAU DISTILLEE	0,8 ml	0,6	0,4	0,2	0	0
ETHANOL A 95^{c}	0,2 ml	0,2	0,2	0,2	0,2	0
PYRIDINE	1,5 ml	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
ANHYDRIDE ACETIQUE	6 ml	6	6	6	6	6
CONCENTRATIONS en µg	0	80	160	240	320	239

- Détermination.

Après chauffage au bain-marie à 40° pendant 30 mn, on effectue les différentes lectures dans les conditions précédemment décrites.

3 - Résultats.

Les quantités d'acide citrique trouvées au cours des différents dosages sont comprises entre 96 et 102 %, rapportées au médicament. Les résultats sont donc satisfaisants. (Figure 16).

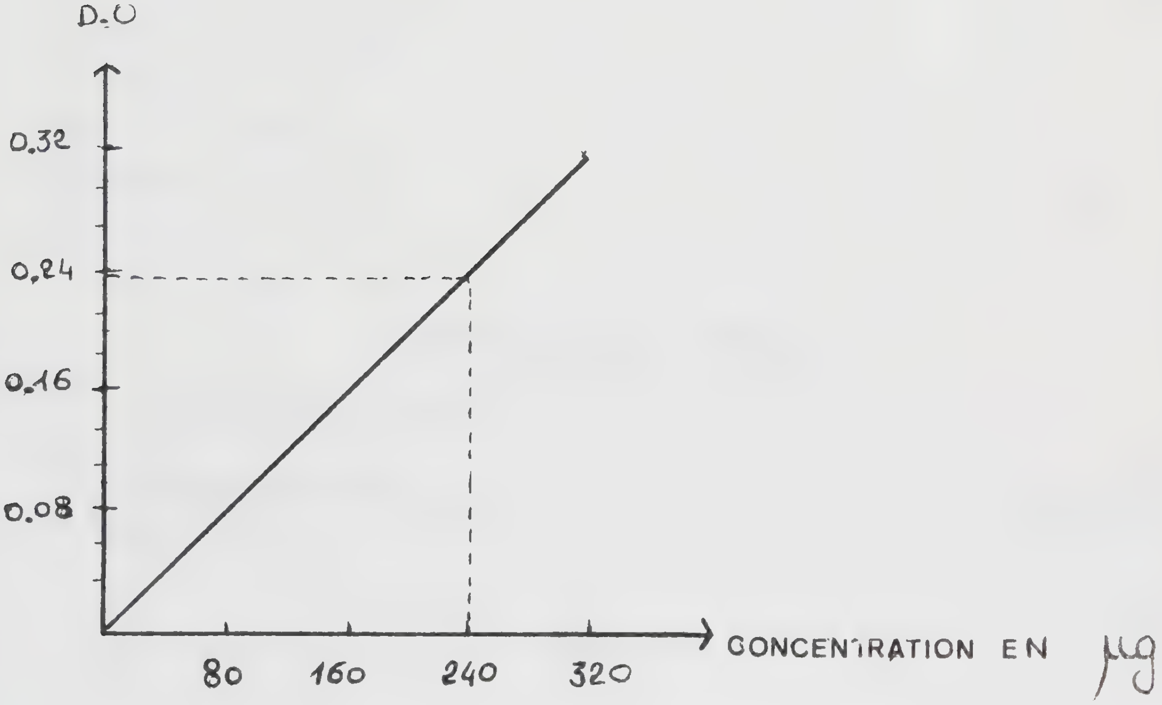


Fig. 16 - Dosage de l'acide citrique.

x x
x

TROISIEME PARTIE

PROBLEME POSE PAR LES INTERFERENCES SIMULTANEES ENTRE DEUX PRINCIPES ACTIFS D'UNE PART, ENTRE L'UN DES PRINCIPES ACTIFS ET L'EXCIPIENT D'AUTRE PART.

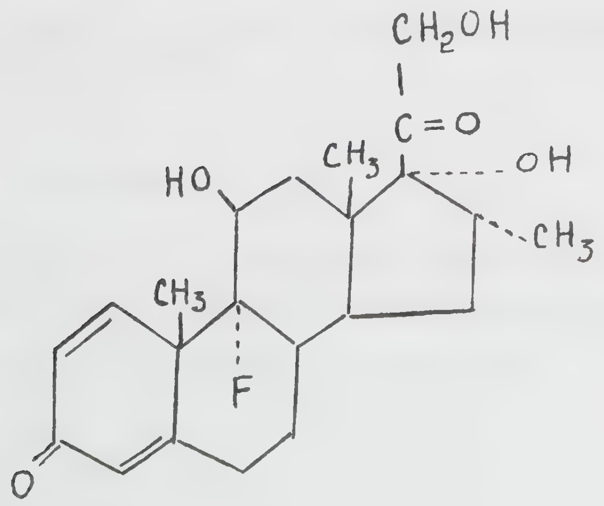
Nous rapportons le cas d'une pommade à base de DEXAMETHASONE, répondant à la formule suivante :

Virginiamycine 100 %	0,525 g
Sulfate de polymyxine B	1 000 000 U.I.
Dexaméthasone base	0,100 g
Cutina M D	15 g
Syndermin GTC	79,46 g
Emulgin C 700	5 g
Oxynex 20041	0,01 g

COMPOSANTS DE LA POMMADE :

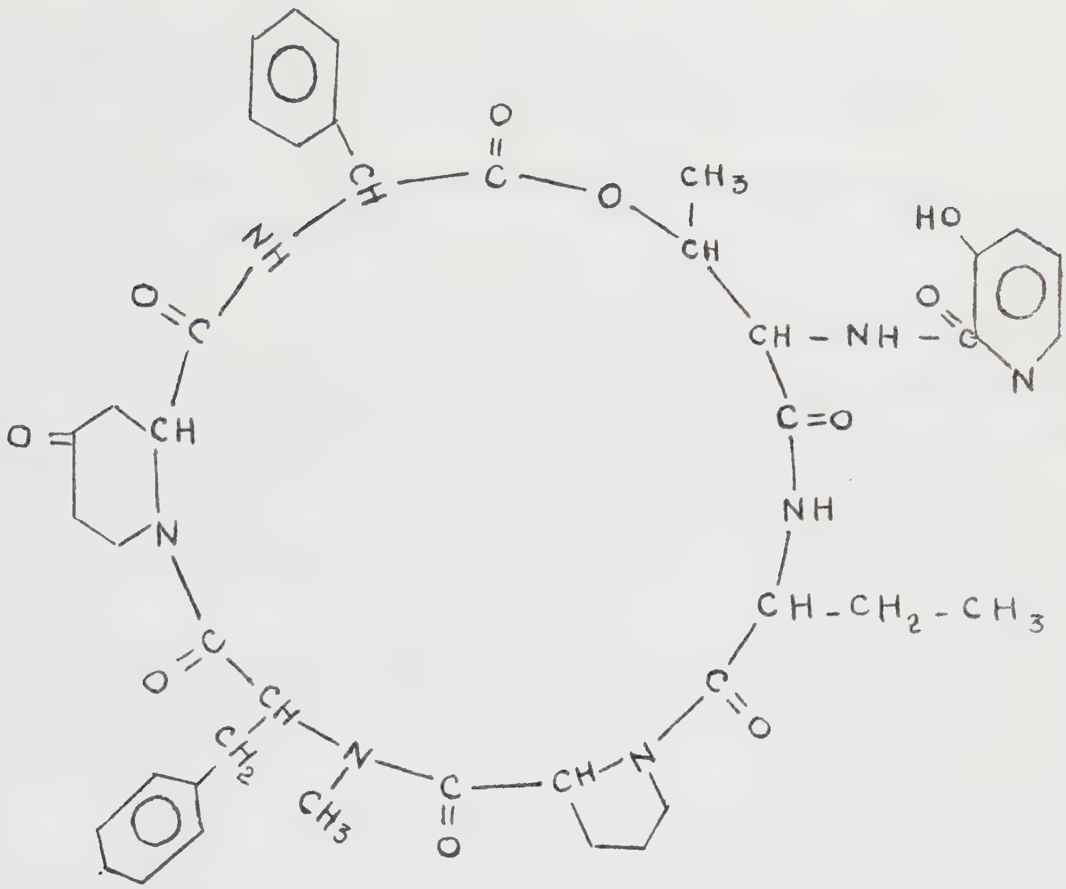
PRINCIPES ACTIFS :

- La dexaméthasone est un 17 - cétostéroïde, utilisé, ainsi que ses sels (sulfate, phosphate,) comme antiinflammatoire.



Dexaméthasone

. La Virginiamycine est un antibiotique phénolique de nature polypeptidique.



Virginiamycine

. La polymyxine B appartient à un groupe d'antibiotiques polypeptidiques.

- EXCIPIENTS :

. Cutina MD est un mélange de mono et de diglycérides d'acides gras saturés, à poids moléculaire élevé et notamment d'acides palmitique et stéarique.

- Syndermin GTC est une huile claire et neutre, de faible viscosité et constituée d'un mélange de triglycérides d'acides gras saturés à longueur de chaîne de C_8 à C_{20}.
- Emulgin C 700 est un polyglycoléther d'alcools gras saturés, qui constitue un émulgateur non ionique.
- Oxynex 20041 est un mélange de butyl-hydroxytoluène et de potentialisateurs.

Le dosage de la dexaméthasone dans la pommade pose un problème par suite d'une double interférence : interférence entre la dexaméthasone et la virginiamycine d'une part, entre la dexaméthasone et les excipients d'autre part.

Nous disposons de deux méthodes :

- Méthode spectrophotométrique dans l'U.V.
- Méthode colorimétrique (réduction d'un sel de tétrazolium).

I - DOSAGE PAR SPECTROPHOTOMETRIE DANS L'U.V.

Nos mesures ont été effectuées sur un spectrophotomètre Unicam SP 800, en cuves de 1 cm.

Nous avons étudié l'absorption de chaque composant de la pommade.

1 - Pour la dexaméthasone, le maximum d'absorption est situé à 245 mn; l'allure spectrale, identique pour des solutions dans l'eau, l'éthanol à 95^c et l'isopropanol, (Figure 17), est légèrement différente pour une solution chloroformique: la densité optique est supérieure et le pic est plus étroit. (Figure 18). Le maximum est indépendant du pH : Il reste inchangé à pH 4,6 - 7,7 - 9,15 .

2 - <u>La virginiamycine</u> ou staphylomycine présente un maximum d'absorption à 240 nm avec un épaulement aux environs de 280 nm. Le spectre est le même pour des solutions dans l'éthanol à 95^{c} (Figure 19) et dans l'isopropanol. En solution chloroformique, le pic est beaucoup plus étroit et le maximum d'absorption est déplacé à 250 nm (Figure 20).

3 - <u>Le sulfate de polymyxine B</u> est soluble dans l'eau et insoluble dans les solvants organiques; son maximum d'absorption est à 210 nm; il n'absorbe plus à partir de 245 nm.

4 - <u>Pour le mélange des excipients</u> dans les proportions figurant dans la formule de la pommade, le maximum d'absorption est à 230 nm en solution dans l'éthanol à 95^{c} (Figure 21) et dans l'isopropanol, (la densité optique est cependant plus faible dans ce dernier), à 245 nm en solution chloroformique (Figure 22).

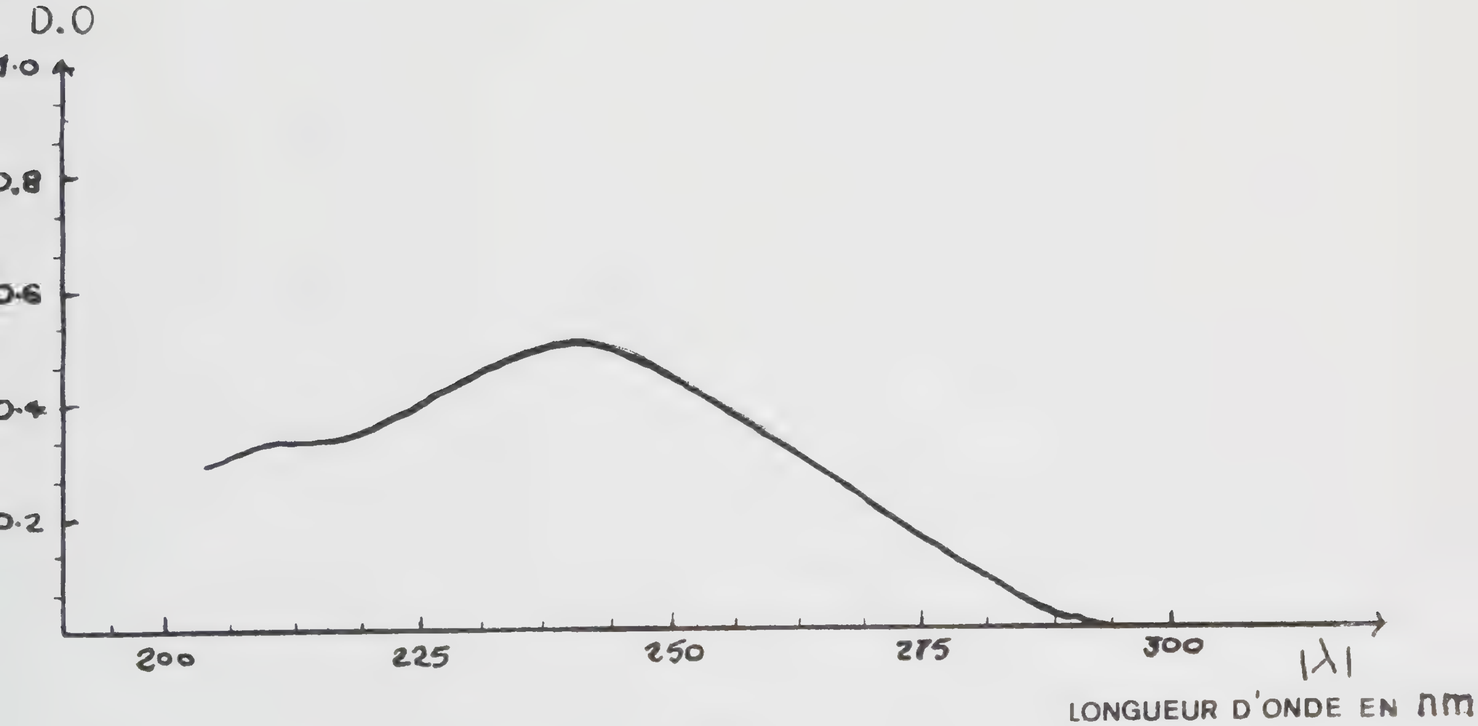


Fig. 17 - Spectre d'absorption de la dexaméthasone en solution alcoolique à 10 µg/ml.

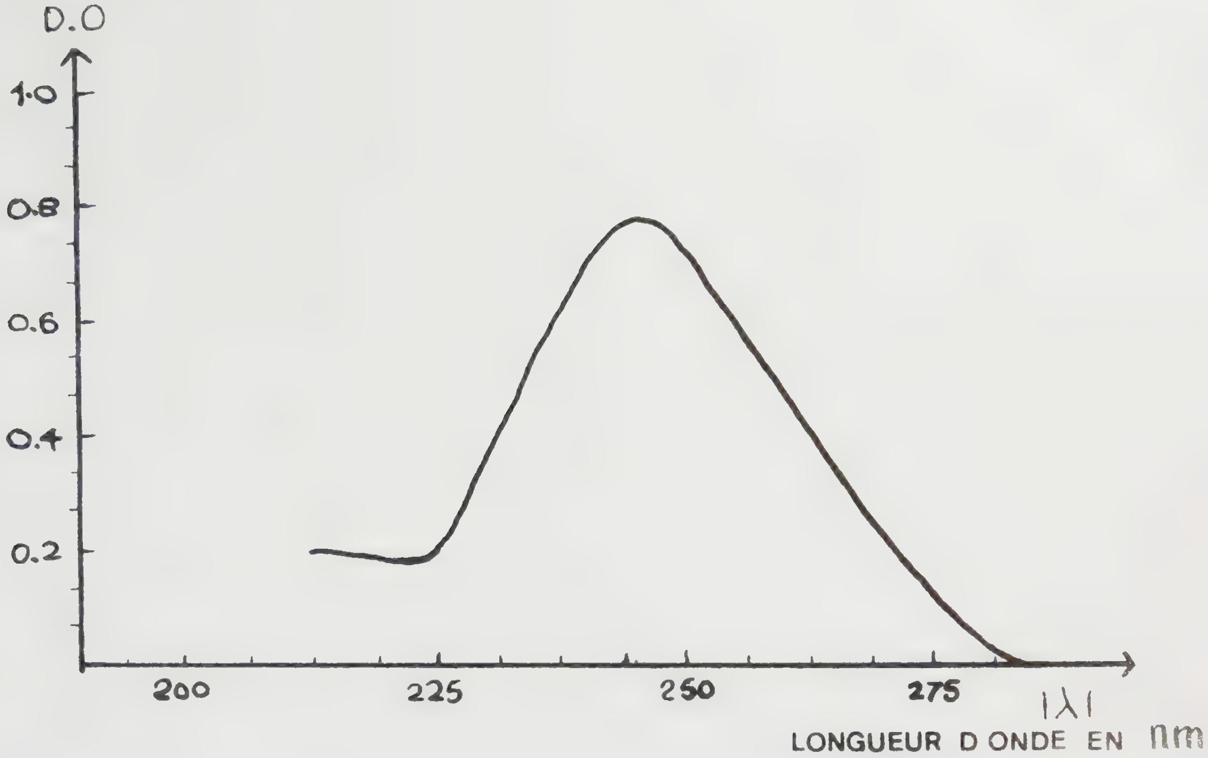


Fig. 18 - Spectre d'absorption de la dexaméthasone en solution chloroformique à 1 µg/ml.

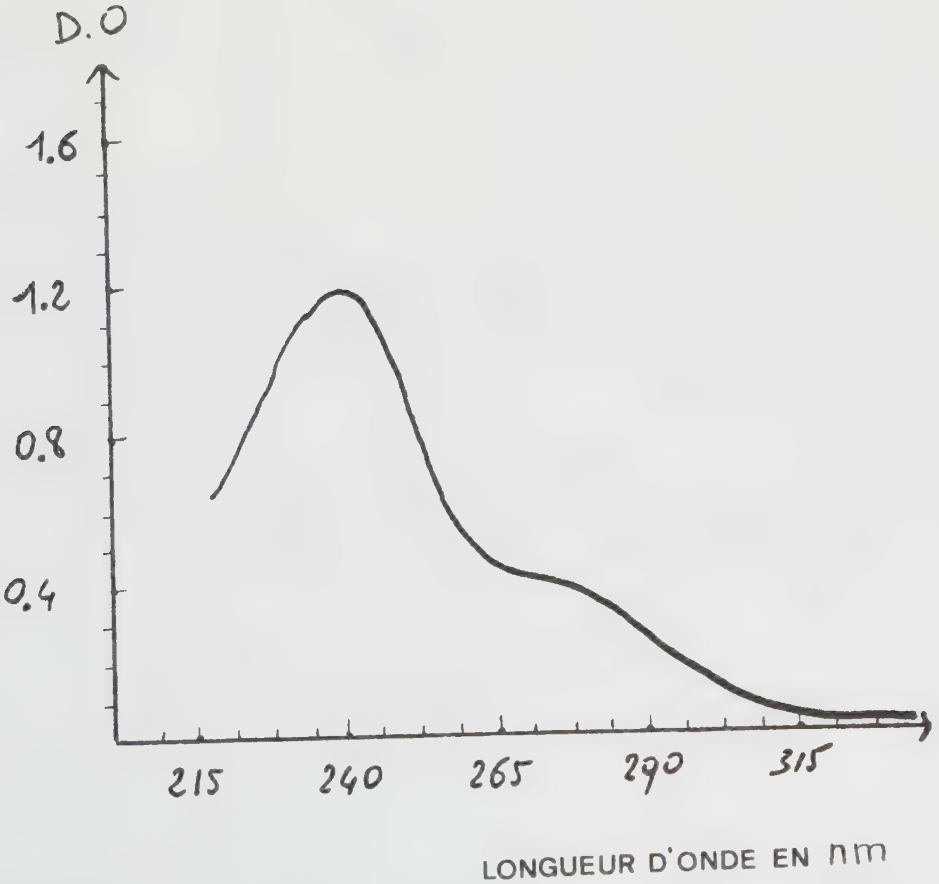


Fig. 19 - Spectre d'absorption de la Virginiamycine en solution alcoolique à 50 µg/ml.

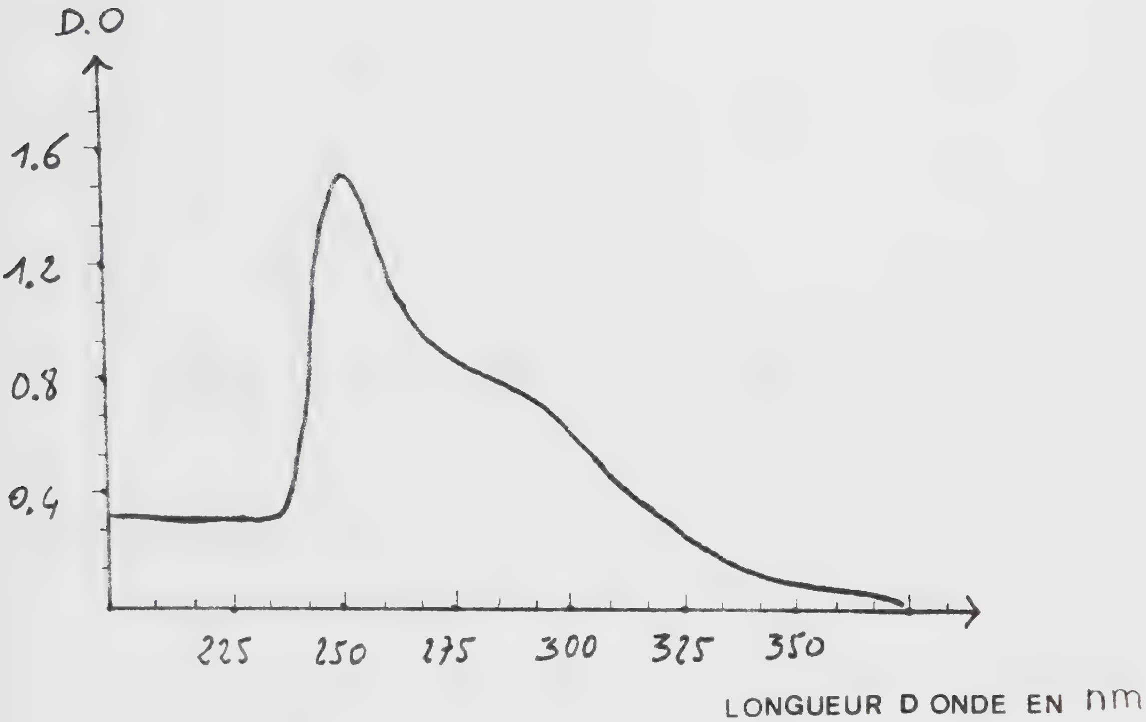


Fig. 20 - Spectre d'absorption de la Virginiamycine en solution chloroformique à 50 µg/ml.

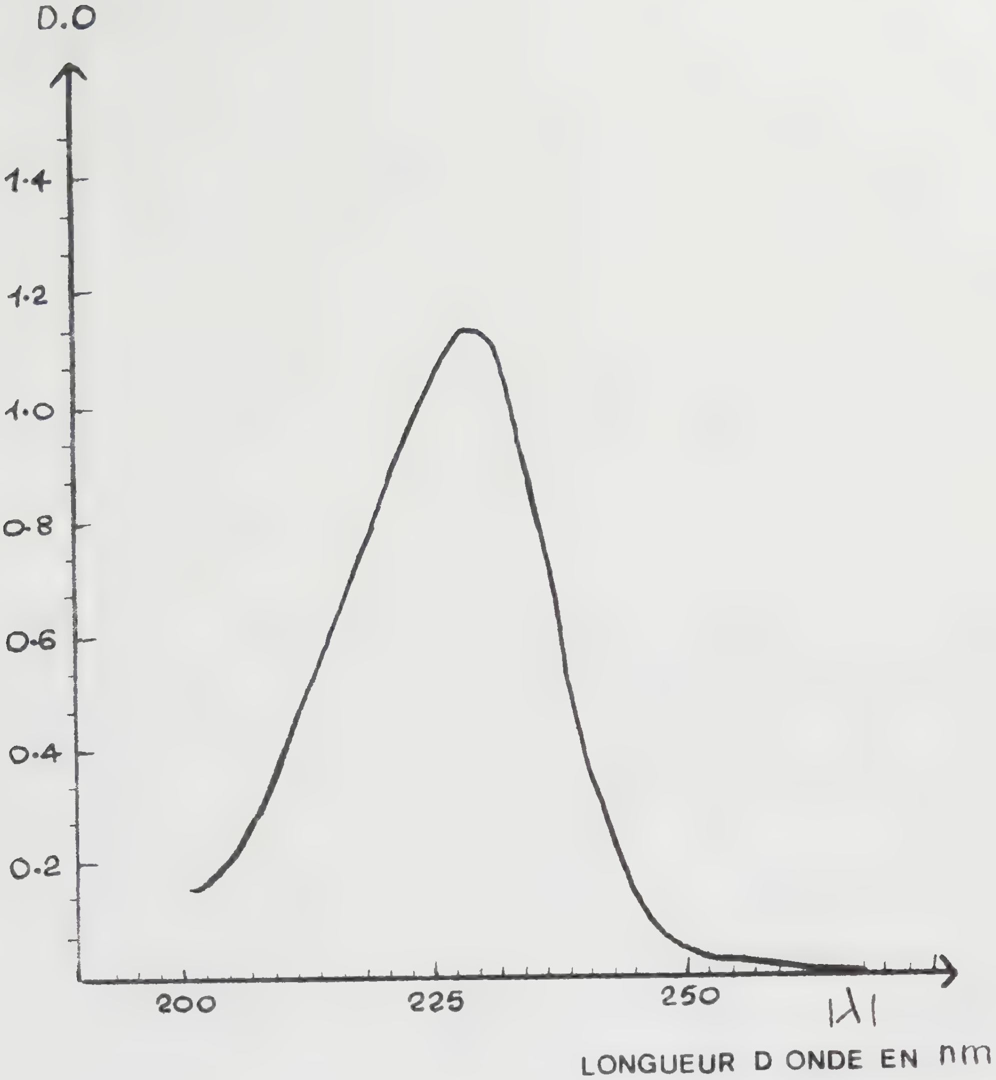


Fig. 21 - Spectre d'absorption de l'excipient, réalisé sur 1 g dissout dans 100 ml d'alcool.

Ces observations sont rassemblées dans le tableau suivant :

	max (nm)
Dexaméthasone	245
Virginiamycine	240-250
Excipients	230-245
Sulfate de Polymyxine B	210

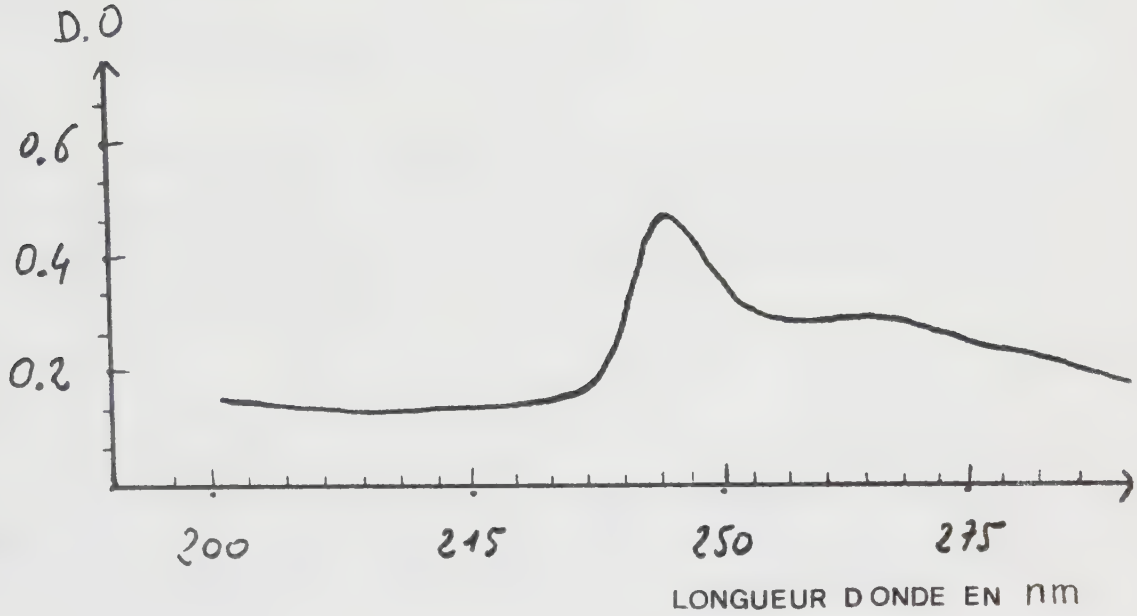


Fig. 22 - Spectre d'absorption de l'excipient réalisé sur 1 g dissout dans 100 ml de chloroforme.

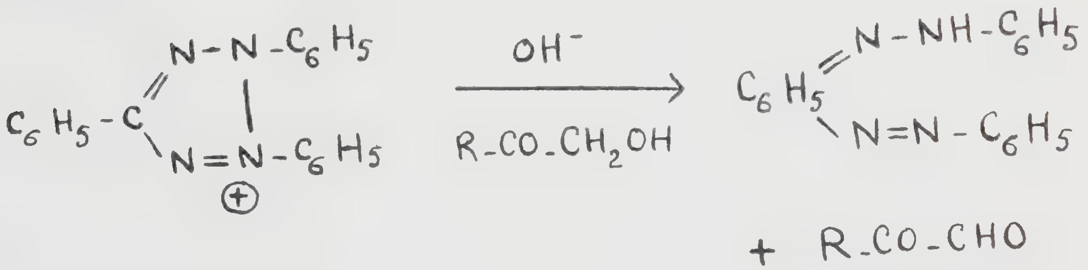
Ainsi donc, si le sulfate de polymyxine B n'est pas gênant, la virginiamycine et les excipients absorbent sensiblement aux mêmes longueurs d'onde que la dexaméthasone, dont le dosage est par conséquent impossible par spectrophotométrie dans l'U.V.

II - DOSAGE COLORIMETRIQUE APRES REDUCTION DU CHLORURE DE TRIPHENYL - 2,3,5 TETRAZOLIUM.

Nous nous sommes alors adressés à la méthode colorimétrique mettant à profit la réduction des sels de triphényl-2,3,5 tétrazolium par les cétols.

- Principe de la réaction:

Les sels de tétrazolium sont réduits par les cétols en milieu alcalin, en formazan, dont la coloration rouge se prête, dans des conditions bien déterminées, à une mesure colorimétrique (49).



La réaction est effectivement valable pour la dexaméthasone, mais elle est également positive avec la virginiamycine et les excipients.

A - ETUDE DE LA REACTION AVEC LA DEXAMETHASONE

a - Nous avons précisé les points suivants :

- Spectre d'absorption.
- Loi de BEER-LAMBERT.
- Cinétique de la réaction.
- Influence de la lumière.
- Stabilité de la coloration.

1 - Spectre d'absorption.

Le maximum d'absorption est à 490 nm (Figure 24).

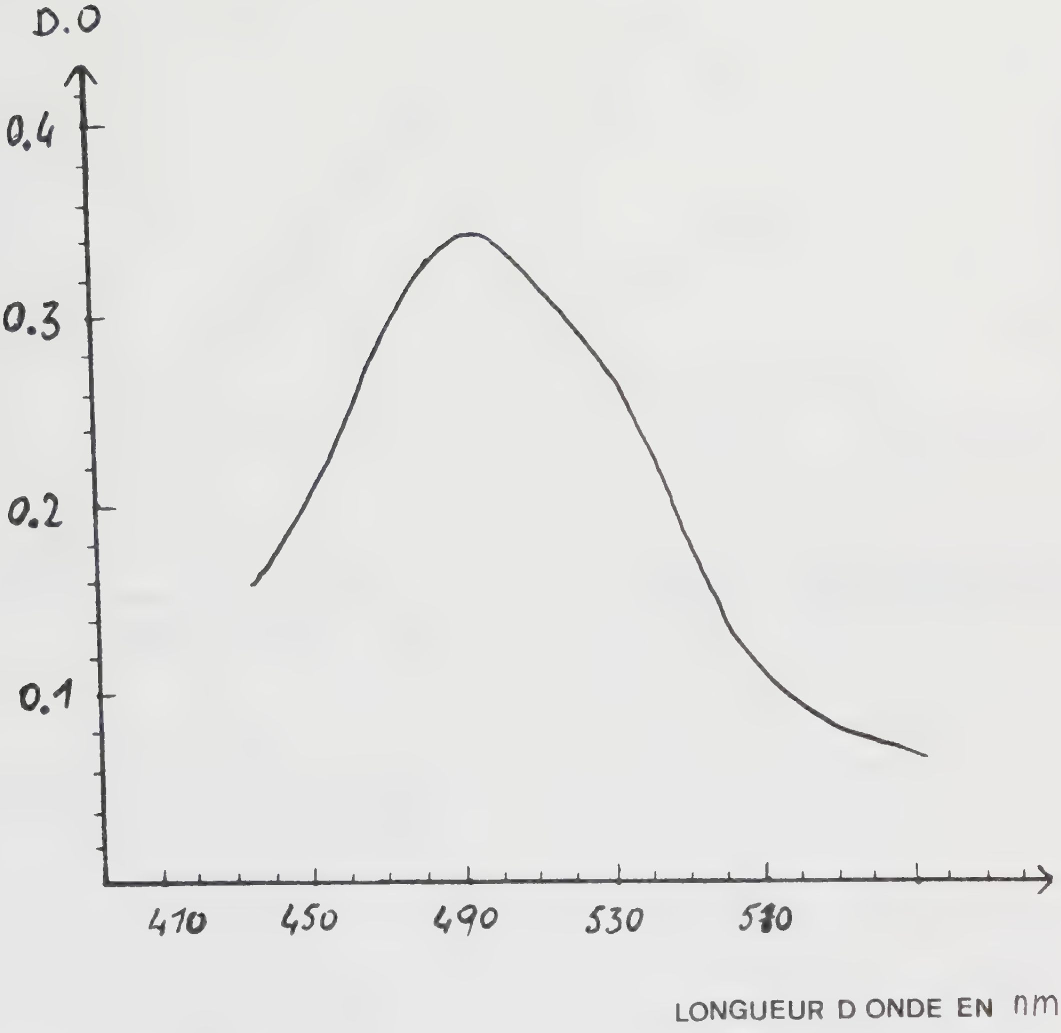


Fig. 24 Mesure effectuée sur une prise d'essai de 150 µg de dexaméthasone, pour un volume final de 10 ml.

2 - Vérification de la loi de BEER-LAMBERT.

Les densités optiques sont proportionnelles à la concentration en dexaméthasone pour des valeurs comprises entre 0 et 350 µg dans un volume final de 10 ml; entre 250 et 600 µg dans un volume final de 20 ml (Figure 24).

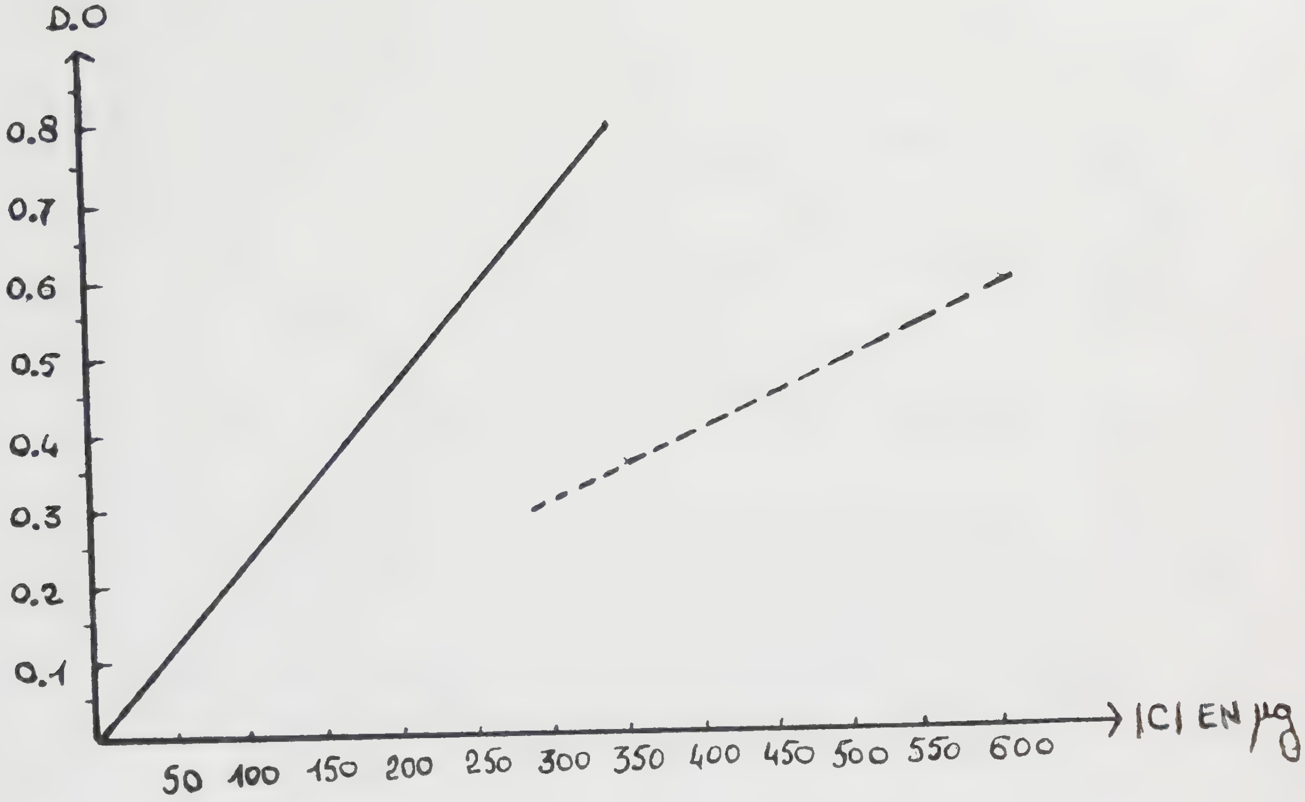


Fig. 25 - Vérification de la loi de BEER-LAMBERT

———— volume final de 10 ml

------- volume final de 20 ml

3 - Cinétique de la réaction et stabilité de la coloration .

De 0 à 200 µg, la coloration augmente d'intensité pendant 40 mn et reste stable pendant 10 mn environ. La stabilité peut être portée à 12 heures par addition d'acide acétique lorsque la coloration a atteint son maximum (Figure 25).

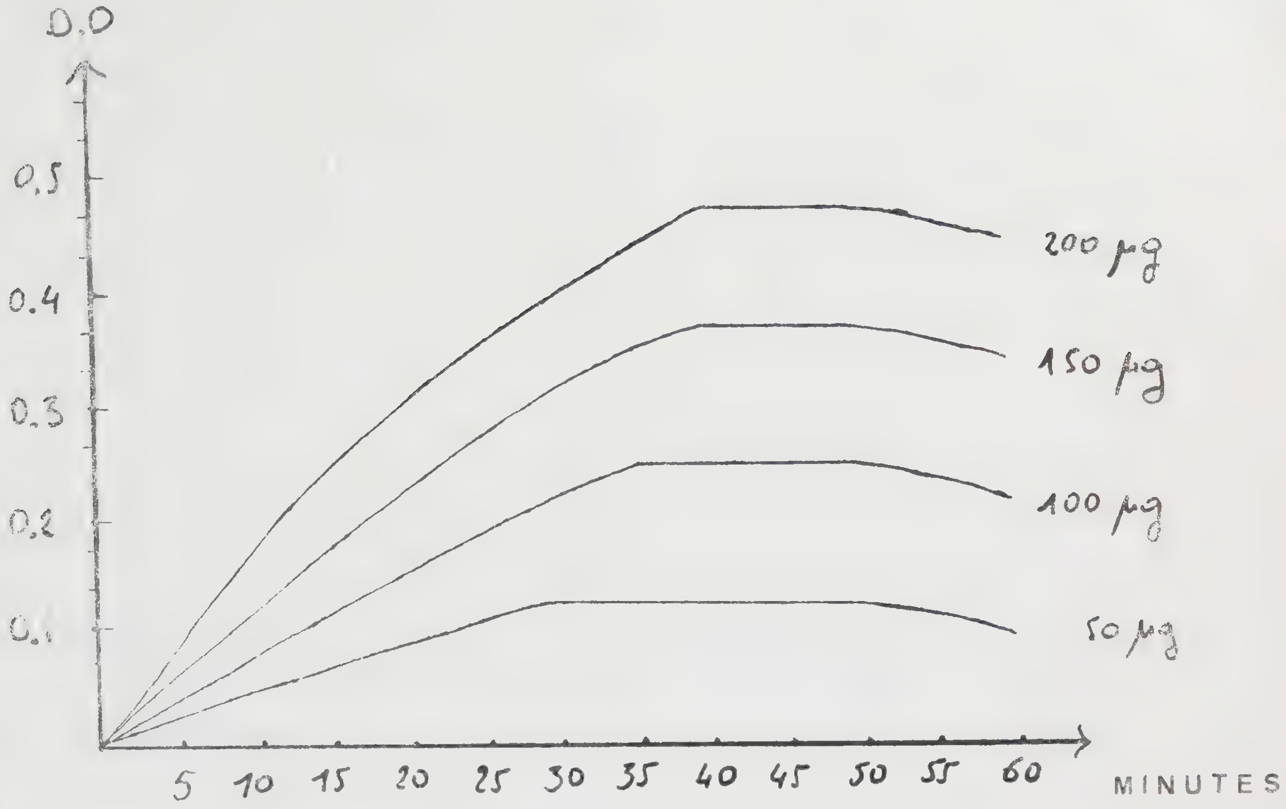


Fig. 25 - Cinétique de la réaction pour des concentrations comprises entre 0 et 200 µg, dans un volume final de 10 ml.

4 - Influence de la lumière.

Sans action sur la cinétique, la lumière influe défavorablement sur l'intensité de la coloration. Les densités optiques sont en effet plus élevées si la réaction est effectuée à l'obscurité (Figure 26).

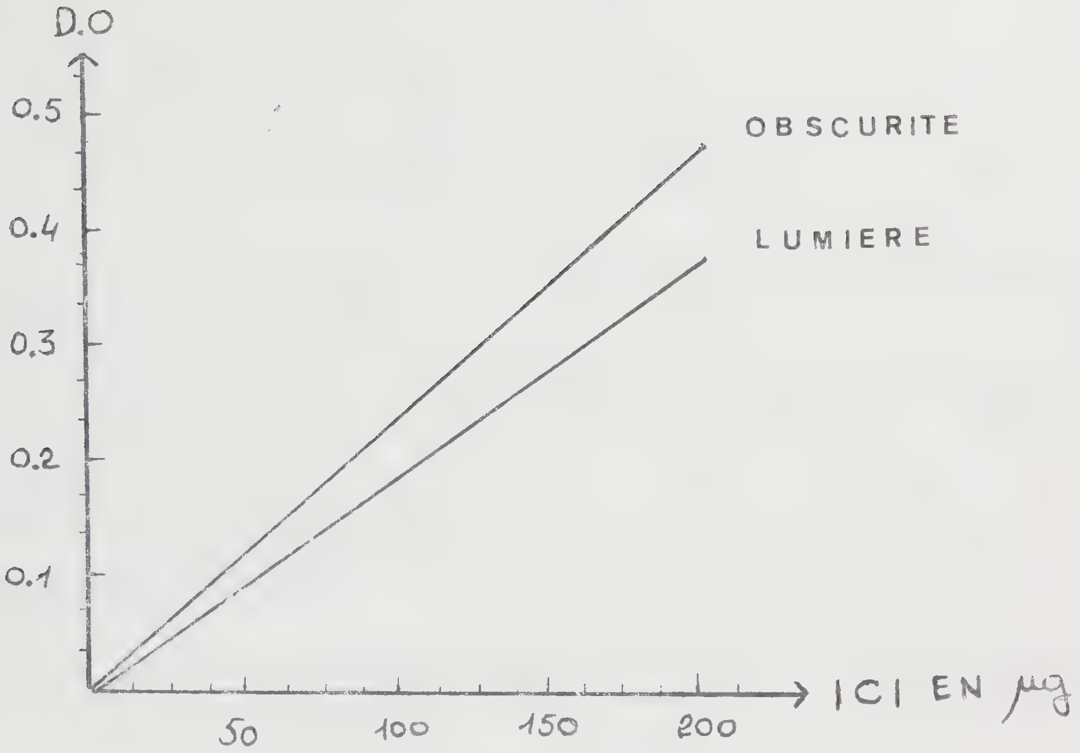


Fig. 26 - Influence de la lumière sur l'intensité de la coloration.

b - <u>Technique proposée</u> :

<u>Réactifs</u> :

- Solution témoin de dexaméthasone à 100 μg/ml dans l'éthanol à 95^{c}.
- Solution de chlorure de triphényl 2,3,5 tétrazolium à 0,5 g % dans le même solvant, préparée extemporanément et conservée à l'abri de la lumière.
- Dilution éthanolique à 10 % de la solution commerciale (à 10 % dans l'eau) d'hydroxyde de tétraméthylammonium.

<u>Etalonnage</u> :

	1	2	3	4	BLA
SOLUTION ETALON	0,5	1	1,5	2	0
ETHANOL à 95^c	9,5	9	8,5	8	10
HYDROXYDE DE TETRA-METHYLAMMONIUM (ml)	1	1	1	1	1
TRIPHENYL TETRAZO-LIUM (en)	1	1	1	1	1
CONCENTRATIONS EN DEXAMETHASONE (en µg/ml)	50	100	150	200	0

Les tubes sont laissés pendant 40 mn à l'obscurité. On ajoute alors dans chacun d'eux 1 ml d'acide acétique cristallisable.

Les lectures sont effectuées à 490 nm contre le blanc réactif.

B - <u>REACTION AVEC LA VIRGINIAMYCINE</u>.

Ce composé donne une réaction très positive aux concentrations dans lesquelles il se trouve dans la pommade étudiée. Son interférence est de l'ordre de 15 à 20 %.

C - REACTION AVEC L'EXCIPIENT TOTAL.

Avec une solution alcoolique de l'excipient total préparée par chauffage et filtration après refroidissement, il apparaît une coloration rose pâle non négligeable. L'interférence est de 7 % environ.

D - APPLICATION AU MEDICAMENT TERMINE.

Ces interférences imposent la séparation préalable de la dexaméthasone à partir de la pommade.

Nous avons étudié et précisé sa solubilité et celle des autres composants dans différents solvants.

Tableau des solubilités des différents composants de la pommade.

../..

	Dexaméthasone	Virginiamycine	Polymyxine	Cutina	Syndermin	Emulgin	Oxynex
EAU	10 mg p. 100	insol.	sol.	insol.	insol.	insol.	insol.
ETHANOL A 95^c	sol.	sol.	insol.	sol.à chaud à froid	sol.	sol.	sol.à chaud à froid
CHLOROFORME	sol.	sol.	insol.	sol.	sol.	sol.	sol.
CYCLOHEXANE	insol.	insol.	insol.	insol.	sol.	sol.à chaud à froid	insol.
ACETONE	sol.	sol.	insol.	sol.à chaud à froid	sol.	sol.à chaud à froid	sol.
ISOPROPANOL	sol.	sol.	insol.	sol.	sol.	sol.	sol.

a - <u>Extraction</u>.

De ces solubilités, nous avons déduit une méthode d'extraction.

Essais préliminaires :

- Les excipients et la virginiamycine étant insolubles dans l'eau et la dexaméthasone étant soluble dans des proportions suffisantes, la pommade est d'abord traitée par ce solvant. Nous obtenons une suspension laiteuse qu'il n'est pas possible de clarifier.

- Un traitement de la pommade par du cyclohexane suivi d'une filtration à chaud permet de séparer les principes actifs de l'excipient. Le résidu composé de dexaméthasone, de virginiamycine et de sulfate de polymyxine, est repris par du chloroforme qui solubilise seulement les deux premiers composés.

La solution est alors traitée par une solution 0,1 N d'hydroxyde de sodium en vue de salifier les fonctions phénols de la virginiamycine; les dérivés sodés formés sont solubles dans l'eau.

Mais les dosages par spectrophotométrie et colorimétrie montrent que la virginiamycine n'a pas été suffisamment extraite, quelles que soient les quantités d'hydroxyde de sodium mises en oeuvre.

- Nous avons procédé à plusieurs extractions de la pommade au Soxhlet à l'aide de solvants variés et en particulier de benzène, qui ne solubilise que la virginiamycine.

Le dosage de la dexaméthasone dans une solution éthanolique du résidu est très déficitaire.

- Considérant la nature polypeptidique de la virginiamycine, nous avons essayé :

1°) de la précipiter par la chaleur en milieu alcoolique. Pour y parvenir et pour assurer une bonne dissolution de la pommade, nous avons cru devoir opérer au bain-marie bouillant.

2°) de refroidir suffisamment le liquide pour provoquer la prise en masse des excipients et entraîner avec eux la virginiamycine floculée. Dans un premier temps, nous avons adopté la température de - 15°.

Bien que la solution surnageant le culot soit incolore (la virginiamycine est jaune), l'antibiotique n'est pas totalement éliminé. Le dosage spectrophotométrique de la dexaméthasone est en effet excédentaire. Mais sa concentration, environ 5 fois plus faible qu'au départ, est insuffisante pour perturber le dosage colorimétrique.

Par contre, l'excipient total reste partiellement en solution et interfère.

Nous sommes malgré tout venue à bout de tous ces obstacles :

. En modifiant la température et la durée de chauffage permettant la dissolution de la pommade dans l'alcool et la précipitation de la virginiamycine. Nous nous sommes aperçue qu'il n'est pas nécessaire d'opérer au bain-marie bouillant et que le résultat est atteint dès la température de 50° que nous avons retenue.

. En abaissant la température de prise en masse à - 32°.

Dans ces conditions, l'élimination de l'excipient est plus poussée et son interférence ne se fait plus sentir au cours du dosage colorimétrique.

b - Protocole opératoire.

A la suite de cette série d'essais, nous sommes en mesure de proposer le protocole opératoire suivant :

1 - Séparation de la dexaméthasone.

On pèse exactement 1 g de pommade dans un tube à centrifuger. On ajoute 20 ml d'éthanol à 95° et porte au bain-marie à 50° en agitant avec un agitateur de verre pendant 2 mn.

La solution est portée à - 32° jusqu'à prise en masse de l'excipient qui se rassemble au fond du tube.

Après avoir remis en suspension la phase solide dans le liquide surnageant incolore, à l'aide de l'agitateur, on centrifuge à 4 000 t/mn pendant 5 mn, puis on filtre le liquide surnageant sur filtre imbibé d'éthanol à 95°, en recueillant le filtrat dans un ballon jaugé de 100 ml.

On reprend l'excipient contenu dans le tube à centrifuger par 20 ml d'éthanol à 95° et on répète les mêmes opérations, en vue de parfaire l'extraction.

Le filtre est lavé avec de l'éthanol à 95° que l'on ajoute aux liquides d'extraction dans le ballon de 100 ml, et on complète au trait de jauge avec ce solvant.

On obtient théoriquement une solution éthanolique de dexaméthasone à 10 µg/ml.

2 - Dosage de la dexaméthasone.

On établit une gamme d'étalonnage comme précédemment sur 50, 100, 150 et 200 µg de dexaméthasone, à partir d'une solution alcoolique témoin à 100 µg/ml.

D'autre part, on verse dans un tube à essai identique à ceux utilisés pour la gamme étalon 10 ml de solution éthanolique extractive.

On ajoute dans tous les tubes (gamme et solution extractive) :

- 1 ml de dilution d'hydroxyde de tétraméthylammonium.
- 1 ml de solution de triphényl tétrazolium.

On effectue les différentes lectures dans les conditions décrites plus haut.

3 - Résultats.

Les quantités de dexaméthasone trouvées lors des différents dosages sont comprises entre 95 et 100 mg pour 100 g de pommade. L'erreur est donc de 5 %.

x x

x

CONCLUSION

Nous proposons la solution de quelques problèmes posés par le contrôle physico-chimique des médicaments. Ils sont essentiellement liés à l'extraction des principes actifs et au choix de méthodes analytiques convenables.

- La Diphésatine est dosée dans un sirop par spectrophotométrie dans le visible après extraction acétonique et élimination du colorant par passage sur une colonne de Florisil.

- L'utilisation de la semi-micro volumétrie nous a permis de doser le citrate de moxisylyte dans une pommade après dissolution dans le chloroforme.

- La Vitamine PP a été séparée des autres constituants d'un médicament polyvitaminé par chromatographie sur couche mince et dosée spectrophotométriquement.

- L'application d'une réaction de précipitation de l'acide tartrique a rendu possible le dosage colorimétrique de l'acide citrique dans un granulé contenant ces deux acides.

- Le dosage de la dexaméthasone dans une pommade, en présence de composants génants au point de vue analytique, a été réalisé par colorimétrie, après extraction alcoolique à des températures bien déterminées.

D'une telle étude, il résulte qu'en matière de médicament, il ne saurait être question de méthodes systématiques, de méthodes générales de contrôle. Chaque formule se présente comme un cas particulier. Les embuches s'accumulent sur les pas de l'analyste. Elles sont parfois, mais pas forcément, prévisibles.

Le contrôle est une école incomparable de modestie et de prudence, excluant toutefois le découragement. Il n'est pas de problème qui ne puisse être résolu.

---=---

B I B L I O G R A P H I E

1. BACKSTROM H. - Z. Anal. Chem. 1942, 123, p. 96 - 112.

2. BEUTLER E. YEH M. - J. Lab. Clin. Med., 1959, 54, p. 125 - 31.

3. BIGNARDI G., SALARIS P. - Bull. Chim. Farm, 1967, 106, p. 813.

4. BOVET D., MADERNI P. - C.R. Soc. Biol. 1933, 114, p. 890.

5. Brevet P. V. 879 - 220, 16 Nov. 1961.

6. BRITISH PHARMACEUTICAL CODEX, 1968, p. 568.

7. BRITISH PATENT, 745070, 1956.

8. BURGER K. - Talanta, 1963, 10, p. 573 - 582.

9. BUZAS A., TESTE J., FROSSARD J. - Bull. Soc. Chim. France. 1959, n°6, p. 839 - 849.

10. CATTELAIN E. - J.de. Pharm. et Chim. 1930, 80, p. 112 - 122.

11. CHAPARD C., BERTUCAT M., BANCONS C., Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 1970, 109, p. 33 - 41.

12. CHAPARD C., MESNARD P., BANCONS C. - Ann. Ph. Fr. 1970, 28, n° 7 - 8. p. 515 523.

13. CHRISTENSEN G., SALARIS P. - Bull. Chim. Farm. 1931, 38, p. 47 - 69.

14. CROCKETT R., CRENIE D., MESNARD P. - Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 1969, 108, 61 - 85.

15. DAGLEY S. - Methods of Enzymatic Analysis, verlag chemie weinheim and Academic Press, New-York, 1963, 313.

16. DENIGES G. Bulletin des travaux de la Soc. de. Pharm. de Bordeaux 1898, 38, p. 33 - 40.

17. DIA S., GUYOT J.C., LEMAHIEU G., TRAISNEL M. J.Pharm. Belg. 1971, 26, n° 6, p. 638 - 42.

18. FOSTER J.S., MURFIN J.W., J. Pharm. Pharmacol. 1961, 13, 126 T - 132 T.

19. FRIEDMAN T.E., Methods in Enzymology. Ed. COLOWICK et KAPLAN 1957, vol III.

20. FRIEDMAN T.E., FRAZIER E.I. - Arch. Bioch. 1950 26, p. 361.

21. FRODYMA M.M., Anal. Chem. 1967, 39, n° 7, p. 814 - 20

22. FURTH O., HERMANN H. - Biochem. Z. 1935, 280, p. 448 - 457.

23. GORDON H. - Anal. Chem. 1951, 23, 1853 - 8.

24. GRAIL G.F., TENENBAUM L.E., TOLSTOOUHOV A.V. DUCA G.F., REINHARD J.F., ANDERSON F.E., SCUDI J.V., - J. Amer. Chem. Soc., 1952, 74, 3, p. 1313 - 15.

25. Melle HALOT D., Melle LANSON M. Ann. Ph. Fr. 1971, 29, n° 11, p. 533 - 39.

26. HOCHBERG M., MELNICK D., OSER B.L., J. Biol. Chem. 1944, 155, p. 109 - 119.

27. KAHANE M., SACKUR O., Ann. Ph. Fr. 1953, 11, p. 103.

28. KOGAN A.I. - Zeits. F. Anal. Chem., 1930, 80, p. 112 - 122.

29. LABORATORY PRACTICE G.B. 1968, 17, n° 4, p. 448 - 9.

30. MACHEK G. et coll. - Scientia. Pharmacentica., 1960, 28, p. 1 - 7.

31. MAJOR A.J.R. - Ass. Off. Aq. Chemists., 1964, 47, p. 688.

32. MARIET J.R., BOULET M. - J. Doury. Sci. 1958, 41, p. 1683 - 1692.

33. MASSA V. J. Soc. Ph. Montpellier., 1969, 29, p. 35 - 42.

34. MERCK E. - Vitaminanalyse. Chemische. Methoder, Darmstadt, 1961.

35. MESNARD P., CHAPARD C., BERTUCAT M., TRARIEUX, Toulouse Pharmaceutique, 1er Semestre 1967, 14, n° 1, p. 59 - 63.

36. MESNARD P., DEVAUX G., BERTUCAT M., - Bull. Soc. Ph. Bordeaux, 1965, 104, p. 145 - 151.

37. MITCHELL et coll. - J. Pharm. Pharmacol., 1957, 9, p. 42 - 5.

38. MULLER P.B., MOOR H., - Trav. de Chim. Aliment. et Hyg., 1949 xL, p. 397.

39. NARUSE H., CHENG S.C., WAELCH H., - Exp. Braim. Res., 1966, 1, p. 40 - 7.

40. NATELSON S., PINCUS J., LUGOVOY J. - J. Biol. Chem. 1948, 175, p. 745 - 50.

41. PAHLICKE H., cerman patent, 905, 738, 2 Nov. 1954.

42. PAHLICKE H., C.A. 1958, 52, 1 6294 i.

43. PELLERIN F., GAUTIER J.A., DEMAY D. - Ann. Ph. Fr. 1962, 20, n° 2, p. 97 - 104.

44. PELLERIN F., GAUTIER J.A., DEMAY D. - Ann. Ph. Fr. 1964, 22, n° 8 - 9, p. 459 - 504.

45. PELLERIN F., GAUTIER J.A., DEMAY D. - Ann. Ph. Fr. 1964, 22, n° 10, p. 559 - 69.

46. Pharmacopée U.R.S.S. 1961, p. 278.

47. PUCHER G., SHERMAN C., VICKEY H. - J. Biol. Chem. 1936, 113, p. 235 - 45.

48. STAINIER C.- Analyse des médicaments. Deuxième partie. 3e éd. Les presses Universitaires de Liège, 1964.

49. STAINIER C., LAPIERE C.- J. Pharm. Belgique 1956, 11, p. 191 - 199.

50. STAHRE H.- Z. Anal. Chem. 1897, 36, p. 195.

51. THUNBERG T. - Biochem. Z., 1929, 206, p. 109 19.

52. WULLEN H., THIELEMANS H.- J. Pharm. Belgique 1967, 22, p. 431.

53. RANSY. - Communication présentée aux 4ème journées pharmaceitiques nationales. 15 - 16 - 17 Juin 1951.

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 1

CONSIDERATIONS GENERALES SUR LE CONTROLE DES MEDICAMENTS.

CHAPITRE I - CARACTERE PARTICULIER DU CONTROLE DES MEDICAMENTS. 4

A. Le contrôle des médicaments obéit à une obligation légale 5

B. Le contrôle des médicaments est destiné à garantir la conformité du médicament à la formule 7

C. Le contrôle des médicaments concerne des mélanges complexes 8

D. Problèmes très particuliers posés par le contrôle des médicaments 10

CHAPITRE II - DIFFICULTES POSEES PAR LE CONTROLE PHYSICO-CHIMIQUE DES MEDICAMENTS.. 13

A. Exemples d'interférences entre le principe actif et l'excipient 14

B. Exemples d'interférences entre deux ou plusieurs principes actifs 16

C. Problèmes posés par le dosage proprement dit 17

CHAPITRE III - LE CONTROLE DES MEDICAMENTS SE RESOUD EN DEFINITIVE A DES CAS PARTICULIERS 19

Exemple de la sulfadiazine 19

A. Sulfadiazine seule 21

B. Sulfadiazine associée à d'autres sulfamides

C. Sulfadiazine associée à des principes actifs non sulfamidés 22

TRAVAUX PERSONNELS. Pages

P R E M I E R E   P A R T I E -

PROBLEMES POSES PAR LES INTERFERENCES ENTRE LE PRINCIPE ACTIF ET L'EXCIPIENT 25

CHAPITRE I - DOSAGE DE LA DIPHESATINE DANS UN SIROP 26

I - Dosage de la diphésatine pure 27

travaux antérieurs 27

travaux personnels 28

II - Dosage de la diphésatine dans le sirop ... 35

CHAPITRE II - DOSAGE DU CITRATE DE MOXISYLYTE DANS UNE POMMADE 40

I - Identification et dosage du moxisylyte ... 42

A - Identification 42

B - Dosage 44

II - Application de ces méthodes à la pommade.. 45

A - Essai de dosage spectrophotométrique en U.V. 46

B - Dosage semimicrovolumétrique 47

C - Identification du citrate de moxisylyte dans la pommade 49

D E U X I E M E   P A R T I E -

PROBLEMES POSES PAR LES INTERFERENCES ENTRE DEUX OU PLUSIEURS PRINCIPES ACTIFS 50

CHAPITRE I - DOSAGE DE LA VITAMINE PP DANS UNE POMMADE 51

I - Dosage du nicotinamide pur 52

II - Dosage du nicotinamide dans le médicament 53

Pages

A - Essai de dosage direct 53
B - Dosage du nicotinamide après extraction 53

CHAPITRE II - DOSAGE DE L'ACIDE CITRIQUE EN PRESENCE D'ACIDE TARTRIQUE 62

I - Dosage de l'acide citrique pur 63
Travaux antérieurs 63
Travaux personnels 64
A - Choix de la méthode 64
B - Etude de la réaction de Furth et Hermann 64
C - Technique proposée 68

II - Dosage de l'acide citrique en présence d'acide tartrique 70

A - Séparation de l'acide citrique 71
B - Protocole opératoire 72
C - Résultats 74

T R O I S I E M E   P A R T I E -
PROBLEME POSE PAR LES INTERFERENCES SIMULTANEES ENTRE DEUX PRINCIPES ACTIFS D'UNE PART, ENTRE L'UN DES PRINCIPES ACTIFS ET L'EXCIPIENT D'AUTRE PART 75

DOSAGE DE LA DEXAMETHASONE DANS UNE POMMADE 75

I - Dosage par spectrophotométrie U.V. 77
II - Dosage colorimétrique 83

A - Etude de la réaction avec la dexaméthasone 83
B - Réaction avec la virginiamycine 88
C - Réaction avec l'excipient total 89

Pages

D - Application au médicament terminé .. 89

a - Extraction 91

b - Protocole opératoire 93

C O N C L U S I O N 95

BIBLIOGRAPHIE 97